Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. E. Helmreich

Entwicklung eines Kompetitions-Assays für Insulin mit Mono-Fluoresceinthiocarbamyl-Insulin

Inaugural-Dissertation
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Rainer Siegl
aus Amberg (Opf.)

Würzburg, den 27. Januar 1981

ENTWICKLUNG EINES KOMPETITIONS-ASSAYS FÜR INSULIN MIT MONO-FLUORESCEINTHIOCARBAMYL-INSULIN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543519_0159

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. E. Helmreich

ENTWICKLUNG EINES KOMPETITIONS-ASSAYS FÜR INSULIN MIT MONO-FLUORESCEINTHIOCARBAMYL-INSULIN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Rainer Siegl

aus Amberg (Opf.)

Würzburg, den 27. Januar 1981

Referent:	Professor Dr. rer. nat. Dieter Palm
Korreferent:	Professor Dr. med. Eberhard Wecker
Dekan:	Professor Dr. med. Karl-Heinrich Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A Einleitung	1 - 6
B Material und Methoden	
I. Material	
1. Wichtige Chemikalien	7 - 8
2. Lösungen	8 - 11
II. Methoden	
1. Proteinbestimmung	12
2. Reinheitsuntersuchungen des Fluorescein-Isothiocyanats	13 - 14
3. Reinheitsprüfung des Rinderinsulins	14
4. Spektroskopische Messungen	15
5. Fluorochrom-Bestimmung	15
6. Präparation von Fluorescein-thiocarbamyl-Insulin	16 - 17
7. Separation des Fluorescein-thiocarbamyl-Insulin-Gemisches	
a) Analytische Cellogelelektrophorese	17
b) Präparative Elektrophorese auf PVC-Träger	18 - 21
8. Insulin Radio-Immuno-Assay	22 - 31
9. Kopplung von Anti-Rinderinsulin-Antikörper an Cellulose	32 - 33
10. Inkubation von Antikörper-gekoppeltem Träger mit fluoreszenzmarkiertem Insulin	34 - 35
11. Dissoziierung des Antikörper-Insulin-Komplexes	35

C Ergebnisse — Seite

1. Bestimmung des molaren Fluorescein-Protein-Verhältnisses — 36 - 37
2. Radioimmunologische Aktivitätsbestimmung von mono-, di- und tri-konjugiertem Fluoresceinthiocarbamyl-Insulin — 37 - 42
3. Proteinbestimmung der Antikörper-Lösung — 43
4. Proteinbestimmung der Antikörper-gekoppelten Cellulose-Plättchen — 43
5. Bestimmung verschiedener Einflüsse auf die Fluoreszenzmessung — 44 - 45
6. Bestimmung der Antigenbindungskapazität der Plättchen — 45 - 46
7. Ansatz für einen Fluoreszenz-Immuno-Kompetitions-Assay — 47 - 49
8. Fluoreszenz-Immuno-Kompetitions-Assay mit konstanter Konzentration markierten Insulins und variablen unmarkierten Insulinkonzentrationen — 49 - 53

D Diskussion und Zusammenfassung — 54 - 57

E Abkürzungen — 58

F Literaturverzeichnis — 59 - 64

A Einleitung

Das Peptidhormon Insulin (MG 5734) wird aus Proinsulin in den Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas gebildet. Es besteht aus zwei Ketten, der A-Kette mit 21 Aminosäuren und der B-Kette mit 30 Aminosäuren. Diese beiden Untereinheiten sind durch zwei Disulfidbrücken interchenar miteinander verknüpft. Außerdem enthält die A-Kette noch eine weitere intrachenare Disulfidbrücke (Abb. 1).

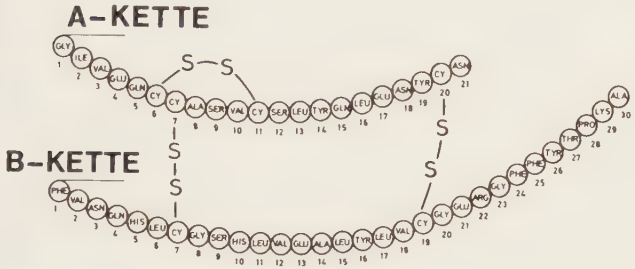


Abb. 1: Aminosäuresequenzformel von Rinderinsulin

Das Hormon bindet leicht Zink, wobei es zu Doppelmolekülen oder zu höheren Aggregaten zusammentritt.

Insulin besitzt eine ausgedehnte Wirkung auf den Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel. Es beschleunigt, mit Ausnahme von Leber und Gehirn, den Glukosetransport in die Zellen, bis es zu einem Gleichgewicht der intra- und extrazellulären Konzentrationen gekommen ist. Zusätzlich fördert Insulin den intrazellulären Abbau der Glukose. Außerdem erleichtert es die Aufnahme der Aminosäuren in die Zellen; deren Verwendung bei der Proteinbiosynthese sowie den Transport von Na^+ und K^+ durch die Zellmembran.

Im Fettgewebe hemmt das Insulin die Freisetzung von Fettsäuren. Gleichzeitig wird die Umwandlung von Kohlenhydrat in Fett gefördert. Auch in der Leber wird die Fettsynthese stimuliert, die Bildung von Ketonkörpern aber gehemmt.

Der Diabetes mellitus, als schon seit langem bekannte Stoffwechselkrankheit, ist das Ergebnis eines Insulinmangels, der entweder durch ungenügende Insulinsekretion oder zu schnellen Insulinabbau zustande kommt. Die durch den Insulinmangel beeinträchtigten metabolischen Prozesse führen zu einer verminderten Glukoseverwertung sowie vermehrter Glukoneogenese, gefolgt von Hyperglykämie und Glukosurie.

Von Wichtigkeit ist die Insulinbestimmung für die Differentialdiagnose der Zuckerkrankheit, deren Therapie und Prognose (1). Ebenso nützlich ist sie für die Diagnose von Insulinomen und anderen hypoglykämischen Zuständen. Schließlich können Insulinbestimmungen im Serum zur Verlaufskontrolle bei der Behandlung von Patienten mit chronischer Pankreatitis dienen.

Eine Vielzahl biologischer in vivo-Methoden wurde ursprünglich für die Bestimmung des Plasmainsulinspiegels verwendet. Da sich jedoch das Insulin im Blut nur in sehr niedrigen Konzentrationen und in den verschiedenartigsten Zustandsformen zeigt, war ihre Anwendung von einer Vielzahl von Nachteilen, wie z. B. niedrige Empfindlichkeit, komplizierte Ausführung und geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse begleitet. So kam als in vitro-Methode der 1960 von Yalow und Berson (2, 3) eingeführte Radio-Immuno-Assay zur Anwendung.

Das Testprinzip des RIA beruht auf identischem immunologischen Verhalten eines zu bestimmenden Antigens in der

Probe und eines Antigens in der Referenz- bzw. Standardsubstanz. Dazu bestimmt man den Hemmeffekt des unbekannten, unmarkierten Antigens auf die Bindung des radioaktiv markierten Antigens an einen spezifischen Antikörper; dies gelingt, wenn man den ermittelten inhibitorischen Effekt mit dem einer bekannten Standardsubstanz vergleicht. Je mehr markiertes und je weniger unmarkiertes Antigen in der Reaktionslösung vorhanden sind, um so mehr radioaktive und um so weniger "kalte" Antigen-Antikörper-Komplexe werden nach einer bestimmten Inkubationszeit gebildet (Abb. 2).

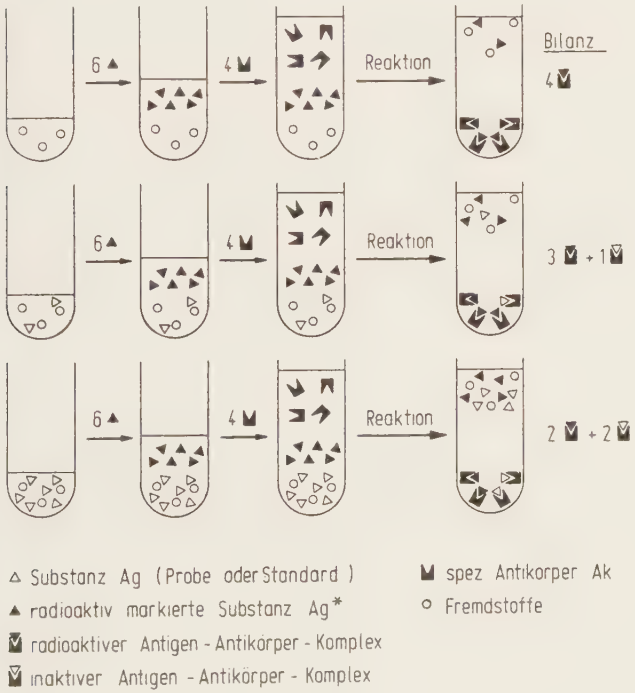


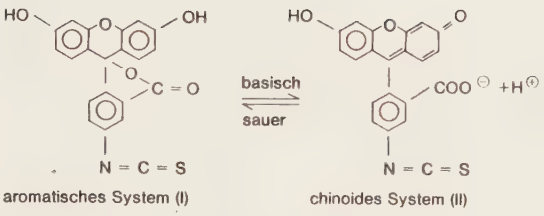
Abb. 2: Prinzip des Radioimmunoassays
(nach H. G. Eckert)

Zahlreiche Veränderungen, die im Laufe der Zeit in den RIA eingebracht wurden (4), haben die Bestimmung des Plasmainsulins heute zu einer einfachen und schnellen Routinemethode vieler Labors gemacht.

Trotz der Vorteile des RIA, wie z. B. seine hohe Spezifität und Empfindlichkeit, Genauigkeit und gute Reproduzierbarkeit, hat er jedoch auch einige nicht zu übersehende Nachteile. Dies gilt sowohl für die Belastung der Umwelt mit radioaktiven Substanzen, als auch für den Erhalt der Umgangsgenehmigung und die Erteilung spezieller Auflagen beim Umgang mit Radioisotopen. Nicht zu vergessen ist aber vor allem die Instabilität des ^{125}J-Markers (Halbwertszeit 60 Tage) und der Denaturierungseffekt auf das Protein-Antigen während der Markierung.

Obgleich im RIA der radioaktiv markierten Komponente eine zentrale Stellung zukommt, muß diese Markierung nicht immer ein Radionuklid sein. Fluoreszenz-Chromophore können Radioisotope als Indikatoren ersetzen, wobei hier - wie beim RIA - durch Anwendung der kompetitiven Testmethode die freie oder an der festen Phase gebundene Fluoreszenz des Reagenzes mit Hilfe eines Fluorometers nachgewiesen werden kann.

Zur Markierung von Antigenen werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Derivate des Fluoresceins - vor allem das Fluoresceinisothiocyanat (Abb. 3) sind heute noch mit Abstand die gebräuchlichsten Fluorochrome. FITC wird durch eine Thiocarbamid-Bindung (Abb. 4) an Protein gebunden.



aromatisches System (I) chinoides System (II)

Abb. 3: Fluoresceinisothiocyanat

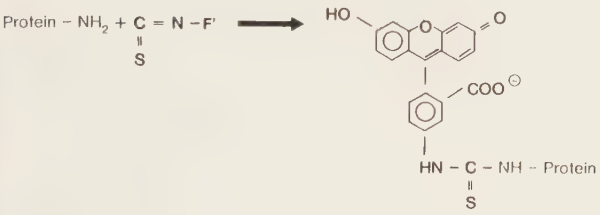


Abb. 4: Reaktion von FITC mit Protein

Mit Insulin (Abb. 5) reagiert es unter Bildung von Fluoresceinthiocarbamyl-Insulin durch Konjugation an Phe (B 1), Gly (A 1) und Lys (B 29) (5, 6, 7, 8, 9, 10). Dies ist in Abb. 6 dargestellt.

Dabei scheint monosubstituiertes FTC-Insulin seine volle immunologische Aktivität zu behalten (11). Beim disubstituierten fluoresceinmarkierten Insulin tritt ein Wirkungsverlust ein und das Trikonjugat zeigt weder biologische noch immunologische Aktivität (7, 8).

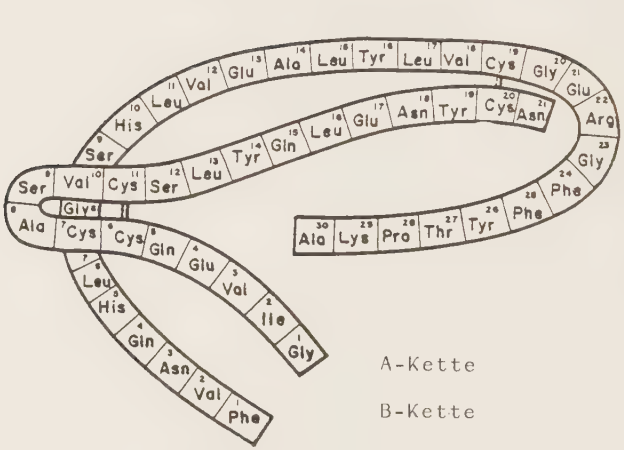


Abb. 5: Insulin-Modell

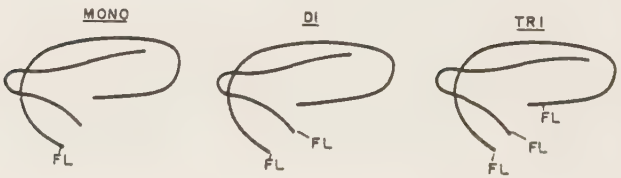


Abb. 6: FTC-Insulin Derivate (nach E. R. Arquilla)

Ziel dieser Arbeit war es, eine quantitative Bestimmungsmethode für Insulin zu entwickeln, die dem Prinzip des Radio-Immuno-Assays entspricht, jedoch den radioaktiven Tracer (^{125}J-Insulin) durch einen Fluoreszenz-Marker ersetzt.

B Material und Methoden

I. Material

1. Wichtige Chemikalien

Äthylenglykolmonomethyl-äther, p. A.	Merck-Schuchardt, Darmstadt
Amberlite MB 1, p. A.	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Anti-Rinderinsulin-Antikörper, vom Meerschweinchen, lyophilisiert, Insulinbindungskapazität: 0,75 IE = 31,25 ug (26)	Miles, Frankfurt
Bromcyan, p. A.	Merck-Schuchardt, Darmstadt
Calciumsulfat, wasserfrei	Fluka AG, Neu-Ulm
Cellulose Blauband Nr. 589^3	Schleicher & Schüll, Dassel
Cellulose Whatman Nr. 3	Schleicher & Schüll, Dassel
DC-Fertigplatten, Kieselgel F 254, 5 x 10 cm	Merck, Darmstadt
Diaflo Ultrafilter UM 2, Ø 25 mm	Amicon GmbH, Witten (Ruhr)
Dioxan, reinst	Merck, Darmstadt
Elphor Membranfolienstreifen 2,5 x 16 cm	Bender & Hobein, München
Fluorescein-Isothiocyanat rein, A-Komponente, MG 389,4	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Folin-Ciocalteus, Phenol-Reagenz, p. A.	Merck, Darmstadt
Harnstoff, p. A.	Merck, Darmstadt

Insulin (Rinder-Pankreas), rekrist., 25,5 IE/mg, Zn 0,73 %, MG 5734	Schwarz-Mann, Division of Becton, Dickinson and Co., Orangeburg, N. Y.
Insulin Kontrollserum (Precilip)	Boehringer, Mannheim
Insulin Radioimmunoassay Kit ^{125}J	Schwarz-Mann, s. o.
Logit-Log Papier	Behring Institut, Frankfurt
Ninhydrin, p. A.	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Pevikon C 870	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Rinderserumalbumin, RIA-grade	Sigma-Chemie, München
Membranfilter SM 11306, Ø 47 mm	Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, rein	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Tween 20 (Laurylsorbitan-polyäthylenglycoläther), rein	Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Alle anderen Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p. A. Sie wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

2. Lösungen

Desaktivierungspuffer

0,5 M Äthanolamin in 2%iger $NaHCO_3$ Lösung, pH 9,0

Dialysepuffer (Acetatpuffer 0,1 M)

Natriumchlorid	29,25 g
Natriumacetat	12,0 g

Essigsäure bis pH 4,5
Aqua dest. ad 1 Liter

Elektrophoresepuffer (Tris-Puffer 0,05 M)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	6,057 g
Harnstoff (entionisiert)	420,7 g

HCl conc. bis pH 7,0 (22°C)
Aqua dest. ad 1 Liter

Entionisierter Harnstoff

5%ige Suspension von Amberlite MB 1 in der Harnstoff-lösung

FIA-Puffer

0,2 % (v/v) Tween 20	2 ml
0,3 % (w/v) BSA	3 g
0,1 % NaN_3	1 g

PBS ad 1 Liter
mit 4 - 5 Tropfen 3 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt

Gelfiltrationspuffer (Phosphatpuffer 0,01 M)

$NaH_2PO_4xH_2O$	1,379 g
NaCl	8,766 g

2 N NaOH bis pH 7,4
Aqua dest. ad 1 Liter

Konjugationspuffer (Carbonatpuffer 0,2 M)

Stammlösung:

0,15 M NaCl	8,766 g	
0,5 M Carbonatlösung A	5,3 g Na_2CO_3	ad 100 ml aqua dest.
0,5 M Carbonatlösung B	4,2 g $NaHCO_3$	ad 100 ml aqua dest.

40 % Carbonatpuffer mit Kochsalz:
8 ml A + 32 ml B + 60 ml 0,15 M NaCl
mit 3 - 4 Tropfen 0,5 M Na_2CO_3 bis pH 9,1

Kopplungspuffer
0,14 M NaCl
0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,5

Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie
Chloroform/Methanol 5 : 1

Ninhydrinpuffer
Herstellung in einer Ein-Liter-Flasche unter N_2-Spülung:
20 g Ninhydrin unter Rühren in 750 ml Äthylenglykolmonomethyläther lösen. 250 ml 4 N Natriumacetat-Puffer, pH 5,5 zugeben. 4 ml $TiCl_3$ zugeben.
(2 Wochen unter N_2 bei 4°C haltbar)

PBS (phosphate buffered saline)

NaCl	6,775 g
Na_2HPO_4 (wasserfrei)	1,419 g
KH_2PO_4	0,408 g

Aqua dest. ad 1 Liter

Ponceau S (Proteinfärbung auf Cellogelstreifen)
0,2 % in 3 % Trichloressigsäure

Proteinbestimmung nach Lowry (12)
Lösung A:
20 g Na_2CO_3, 0,1 N NaOH ad 1 Liter
Lösung B:
a) 500 mg $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ in 50 ml 0,1 N NaOH
b) 1 g Natrium-Kalium-Tartrat in 50 ml 0,1 N NaOH
c) a + b 1 : 1 mischen, filtrieren

Lösung C:

50 ml Lösung A + 1 ml Lösung B (1 Tag haltbar)

Folin-Lösung:

Folin-Phenol-Reagenz mit H_2O 1 : 1 mischen

RIA-Puffer (Phosphatpuffer 0,04 M)

$NaH_2PO_4 \times H_2O$	5,516 g
Rinderserumalbumin	5,0 g

2 N NaOH bis pH 7,4

Aqua dest. ad 1 Liter

II. Methoden

1. Proteinbestimmung

Es wurden zwei Methoden verwendet:

a) Gelöstes Protein wurde nach der Methode von Lowry et al. (12) bestimmt. Eine Standardlösung von 1 mg/ml Rinderserumalbumin diente als Eichprotein. 1 ml Lösung C wurde zu 0,2 ml Protein-Lösung gegeben und bei RT 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml Folin-Lösung wurde gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte bei 578 nm die Extinktionsmessung im Eppendorf-Photometer.

b) Das an die Cellulose-Plättchen gekoppelte Protein wurde nach saurer Totalhydrolyse mit der Ninhydrin-Methode (13, 14) bestimmt. Die Eichgerade wurde mit einer Standard-Rinderserumalbuminlösung (1 mg/ml) und unbeladenen Plättchen erstellt. Zu den Cellulose-Plättchen wurde in Glasröhrchen 0,1 ml Standardproteinlösung bzw. 0,85 % NaCl gegeben. Nach der Zugabe von 0,4 ml 6 N HCl (0,02 % Mercaptoäthanol) wurden die Röhrchen in evakuiertem Zustand zugeschmolzen und bei 110°C 40 h inkubiert. Nach dem Umfüllen in Eppendorf-Reaktionsgefäße folgte ein 10-minütiges Zentrifugieren in der Eppendorf-Zentrifuge 5412. Dann wurden 0,1 ml des Überstandes mit 1 ml Ninhydrin-Puffer versetzt und im Wasserbad bei 100°C 15 min inkubiert. Je 1 ml des Inkubates wurde mit 5 ml 50 % Äthanol versetzt und 60 sec gemischt. Die Extinktionsmessung erfolgte im Hitachi Model 181 Spectrophotometer bei 570 nm. Als Blank diente ein Ansatz von 0,4 ml 6 N HCl (0,02 % Mercaptoäthanol) + 0,1 ml 0,85 % NaCl, der wie oben behandelt wurde.

2. Reinheitsuntersuchungen des Fluorescein-Isothiocyanats

Die Reinheitsüberprüfung des FITC erfolgte auf zweierlei Art und Weise:

a) dünnschichtchromatographisch:
Plattenmaterial: DC-Fertigplatten, Kieselgel F 254, 5 x 10 cm
Laufmittel: Chloroform/Methanol 5 : 1 (v/v)
Probe: 0,1 % (w/v) FITC in Chloroform/Methanol 5 : 1
Sichtbarmachung: UV-Licht bei 366 nm: neben der A-Komponente (R_f = 0,52) konnten noch einige Verunreinigungen festgestellt werden (Abb. 7) (15).

Abb. 7: Dünnschichtchromatographische Analyse von FITC

b) spektrophotometrisch:
Hitachi Model 181 Spectrophotometer
Wellenlänge: 489 nm
Probe: FITC, 1 ug/ml in 0,1 N NaOH
E_{489} 0,205

Nach Mc Kinney et al. (16) beträgt der Extinktionskoeffizient bei 489 nm, einer Schichtdicke von 1 cm und einer Konzentration von 1 ug FITC,A-Komponente / 1 ml 0,1 N NaOH 0,219. Der Reinheitsgrad des verwendeten FITC betrug somit:

$$\frac{0,205}{0,219} \times 100 = 93,6\ \%$$

3. Reinheitsprüfung des Rinderinsulins:

Das Rinderinsulin wurde elektrophoretisch auf seine Reinheit untersucht (8, 17):
Elphor-Micro-Rapid Kammer (Bender & Hobein)
Elphor Membranfolien Streifen (Cellogel):
2,5 x 16 cm
Gesamtspannung: 220 V
Feldstärke: 13 - 14 V/cm
Stromstärke: 1,25 mA
Dauer: 60 min
Temperatur: RT
Puffer: 0,05 M Tris-HCl / 7 M Harnstoff (entionisiert), pH 7,0
Probe: 1 ul einer 1%igen Lösung (~ 10 ug) von Rinderinsulin in Elektrophoresepuffer. Das schlecht lösliche Zn-Insulin wurde durch Zugabe von 3 Tropfen 0,25 N HCl in Lösung gebracht.
Proteinfärbung: Ponceau S
Färbedauer: 5 min
Entfärbelösung: 5%ige Essigsäure
Transparenzlösung: Dioxan / Isobutanol 7 : 3
Ergebnis:
Das verwendete Rinderinsulin erwies sich unter den gegebenen Bedingungen ladungsbezogen als homogene Substanz. Die Laufstrecke der einheitlich im elektrischen Feld gewanderten Proteinkomponente betrug 7 mm.

4. Spektroskopische Messungen

Für die Proteinbestimmung nach Lowry et al. wurde ein Eppendorf Photometer 1101 M verwendet.
Die Messung der Extinktion wurde an einem Hitachi Model 181 Spectrophotometer durchgeführt.
Die Ausführung der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen erfolgte am Fluorescence Spectrophotometer Perkin Elmer 512 Double Beam.
Die Fluoreszenzmessungen wurden im Subtract-Mode im geteilten Lichtstrahl durchgeführt. Die jeweilige Pufferlösung diente dabei als Referenz.
Für die Fluoreszenzmessungen wurde die Standardeinstellung folgendermaßen vorgenommen:
Anregung: 470 nm
Emission: 500 - 540 nm
Slit: 20/20
Sensitivity: 10 bzw. 30
Response: slow
H.V.: 800 V
Die Schichtdicke der verwendeten Küvetten betrug 1 cm.

5. Fluorochrom-Bestimmung

Für bekannte Mengen von an Protein gebundenem FITC wurde unter Verwendung von 0,1 N NaOH als Leerwert ein Extinktionskoeffizient von 0,195 bei 490 nm gefunden. Somit läßt sich die Konzentration für proteingebundenes FITC direkt mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten berechnen:

$$\text{proteingebundenes FITC (ug/ml)} = \frac{E_{490}}{0,195} \quad (18, 19)$$

6. Präparation von Fluoresceinthiocarbamyl-Insulin

Die Konjugation von kristallinem Rinderinsulin (MG 5734) mit FITC (MG 389,4) wurde nach der Methode von Bromer et al. (8) durchgeführt:

172 mg Rinderinsulin (30 uMol) wurden in 4 ml 0,5 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$-Puffer, pH 9,1, gelöst und anschließend mit 6 ml 0,15 M NaCl verdünnt.
Nun wurden 25 mg FITC (60 uMol, bezogen auf 93,6%ige Reinheit) in Pulverform hinzugegeben und bei RT 3 h mäßig gerührt.
Zur Abtrennung des überschüssigen, freien FITC wurde das Reaktionsgemisch bei 4°C 16 h gegen 1 Liter 0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 4,5, dialysiert, und anschließend der isoelektrisch gefällt gelbe Niederschlag in der Sorvall Superspeed RC2-B Zentrifuge 30 min bei 10 000 cpm und 4°C zentrifugiert.
Nach erneutem Auflösen des zentrifugierten FTC-Insulin-Gemisches in 5 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer/0,15 M NaCl, pH 7,4, erfolgte nun eine Proteinkonzentrierung durch Amicon Ultrafiltration.
Das auf 2 ml eingeengte Proteinkonzentrat wurde anschließend zur Beseitigung freien Fluorochroms einer Gelfiltration mittels Sephadex G 25 unterzogen. Als Elutionspuffer diente dabei 0,01 M Natriumphosphatpuffer/0,15 M NaCl, pH 7,4.
Die folgende Dialyse der säulenchromatographisch gereinigten Hauptfraktion erfolgte wiederum bei 4°C 16 h gegen 100 Volumenteile 0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 4,5.
Nochmaliges 30minütiges Zentrifugieren des isoelektrisch gefällten FTC-Insulin-Gemisches mit der Sorvall Superspeed RC2-B bei 10 000 cpm und 4°C und Waschen des Niederschlags mit 3 ml kalter

0,01 M Ammoniumacetatlösung, pH 4,5, beendeten die Reinigung des FTC-Insulins.
Letzteres wurde in vacuo über wasserfreiem $CaSO_4$ lichtgeschützt getrocknet und aufbewahrt (20).
Die Ausbeute an rohem FTC-Insulin-Konjugat betrug 87 % der Theorie.

7. Separation des FTC-Insulin-Gemisches

Zur Auftrennung des Konjugat-Gemisches wurden zwei Methoden verwendet:

a) Analytische Cellogelelektrophorese:
Trennbedingungen: wie in Kapitel B II 3 beschrieben.
Zusätzlich wurden der auf den Cellogelstreifen in 2%iger Lösung aufgetragenen Menge von 20 ug FTC-Insulin-Gemisch 10 ug Rinderinsulin (1%ige Lösung) als Referenzprotein gegenübergestellt (Abb. 8).

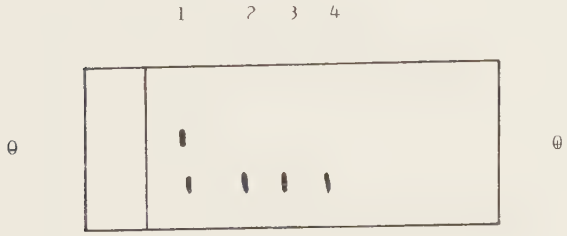


Abb. 8: Trennung von 20 ug FTC-Insulin-Konjugat mittels Cellogel-Elektrophorese
1 = Insulin 2 = M-FTC-I
3 = D-FTC-I 4 = T-FTC-I

b) Präparative Elektrophorese auf PVC-Träger

Dieses von Löfkvist et al. (21) beschriebene Verfahren ermöglicht ein für zahlreiche Fragestellungen ausreichendes präparatives Arbeiten. Die Methodik wurde bei der eigenen analytischen Untersuchung in enger Anlehnung an die von F. Schröpl (22) gemachten Angaben ausgeführt.

Material:
Das Elektrophoresegerät wurde nach eigenen Angaben durch die Institutswerkstätte angefertigt.
Die Elektrophoresekammer besteht aus einem flachen Kunststofftrog, 30 x 20 x 1 cm, mit Schlitzdurchbohrungen an beiden Enden, der auf einen PVC-Kühlblock aufgesetzt ist. An beiden Seitenwänden des Kühlblocks wurde je eine Bohrung von 10 mm Durchmesser mit Ansatzrohr angebracht. Zwei Gummischläuche wurden mit diesen Ansatzrohren verbunden und dienten als Zu- und Abfluß für die Kühlflüssigkeit (Leitungswasser). Hinzu kamen zwei Kunststoff-Puffer-Reservoirs. Als Trägermedium diente Kunststoffpulver Pevikon, ein Kopolymer aus PVC und PVA (Abb. 9).

1000 ml Pevikon Kopolymer wurden zunächst sorgfältig mit Wasser ausgewaschen und die Schwebstoffe mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wurde über einen Büchnertrichter so lange mit H_2O bidest. nachgewaschen, bis die Waschflüssigkeit klar erschien. Danach wurde das Kopolymer mit der für den Versuch vorgesehenen Elektrophoresepufferlösung - 0,04 M Natriumphosphat/7 M Harnstoff (entionisiert), pH 7,0 - nachgewaschen. Das mit Pufferlösung äquilibrierte Pevikon wurde zu pastenartiger

Konsistenz angerührt. In die Schlitzdurchbohrungen an den Breitseiten des Kunststofftrogs wurden mit Pufferlösung angefeuchtete Filterpapierstreifen (Whatman Nr. 3, 20 x 10 cm) eingeführt. Die 1 cm in den Trog reichenden Enden der Filterpapierstreifen wurden in die Pevikonpaste eingebettet. Der ganze Trog wurde anschließend bis zum Rand mit Pevikon aufgefüllt und die Oberfläche glattgestrichen. Überschüssiger Puffer wurde mit Filterpapier abgesaugt.

50 mg des FTC-Insulin-Rohkonjugats wurden in 2 ml Elektrophoresepuffer gelöst und mit der Pevikonmenge der ausgehobenen Startrinne zu pastenartiger Konsistenz angerührt und in die Startrinne eingebracht. Diese wurde folgendermaßen hergestellt:

Etwa 3 cm vom Kathodenrand des Kunststofftroges entfernt wurde eine quer zur Längsachse des Troges verlaufende Rinne von 8 - 10 mm Breite ausgehoben. Beide Wände dieser Rinne wurden nun begradigt, sie müssen genau rechtwinklig zur Laufrichtung liegen. An beide Wände wurde je ein Alufolienstreifen angelegt und und rechtwinklig an der Oberfläche über das Pevikon abgeknickt. Die Folienstreifen verhinderten dabei eine Diffusion des einzufüllenden Materials in die Umgebung; die Trennschärfe wurde auf diese Weise wesentlich verbessert. Außerdem schützten sie die übrige Kopolymeroberfläche beim Einfüllen des Substrats.

Letzteres wurde, wie oben beschrieben, in die entstandene schmale Startrinne eingebracht (leichtes Feststampfen). Die Rinne wurde bis zum Niveau des übrigen Pevikons aufgefüllt. Nach vorsichtigem Herausziehen der Alufolienstreifen wurden die zurückbleibenden feinen

Schlitze durch leichten Druck mit einem Spatel auf die Oberfläche des Pevikons geschlossen.

Trennbedingungen:

Gesamtspannung: 150 V
Feldstärke: 5 - 6 V/cm
Stromstärke: 30 - 35 mA
Dauer: 12 h
Temperatur: RT und Kühlung mittels Kühlblock (Leitungswasser)
Elektrophoresepuffer: 0,04 M Natriumphosphat/ 7 M Harnstoff (entionisiert), pH 7,0.

Die Pevikonoberfläche wurde während des Trennvorganges vor Licht geschützt (Alufolie). Die Kontrolle des Trennvorganges erfolgte durch Sichtbarmachung der aufgetrennten Banden unter UV-Licht (Abb. 10).

Die Wiedergewinnung der einzelnen Fraktionen geschah durch sorgfältiges Auskratzen der entsprechenden Pevikonabschnitte und ihre Aufnahme in je 100 ml H_2O bidest. Nach 30minütigem Rühren erfolgte die Abtrennung der in H_2O bidest. gelösten FTC-Insuline vom Trägermaterial Pevikon mittels Sartorius Membranfiltration. Das Filtrat wurde durch Amicon Ultrafiltration pro Fraktion auf je 1 ml Endvolumen eingeengt und anschließend mittels Sephadex G 25 Gelfiltration mit 0,04 M Natriumphosphatpuffer/0,15 M NaCl, pH 7,4, als Elutionsmittel von Elektrophoresepuffersubstanzen (Harnstoff!) befreit.
Die Aufbewahrung der einzelnen gereinigten FTC-Insulin-Konjugate erfolgte in Polystyrolgläschen lichtgeschützt bei - 18°C.

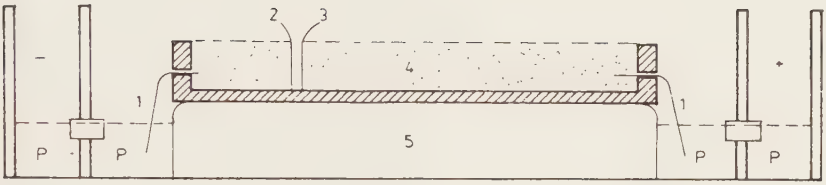


Abb. 9: Versuchsanordnung der PVC-Träger Elektrophorese

P = Puffer-Reservoir
1 = Filterpapierstreifen
2, 3 = Alufolienstreifen
4 = Pevikon
5 = Kühlblock mit daraufliegendem Kunststofftrog (schraffiert)

Abb. 10: PVC-Träger Elektrophorese

1 = Startrinne 2 = Mono-FTC-Insulin
3 = Di-FTC-Insulin 4 = Tri-FTC-Insulin

5. Insulin Radio-Immuno-Assay

Fast jede biologisch interessierende Substanz läßt sich mit einer sonst kaum erreichbaren Spezifität, Empfindlichkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit messen, wenn man dafür den RIA einsetzt. Hierin bestimmt man den Gehalt von Antigen in einer Probe, indem man diese mit bekannten Konzentrationen der Substanz vergleicht. Das gesuchte Antigen konkurriert in der Bindung an spezifische Antikörper mit markiertem Antigen.
Anhand der Abbildungen 2 und 11 b wird das generelle Prinzip am Beispiel der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Insulinbestimmungsmethode dargelegt (23, 24, 25).
Einer Probe mit unbekanntem Insulingehalt wird eine bekannte Menge radioaktiv markierten Insulins zugegeben. Inkubiert man nun mit einer genau definierten Menge von Antikörpern gegen Insulin, so reagieren kaltes und radioaktives Insulin kompetitiv mit den spezifischen Bindungsstellen der Antikörper. Während der Inkubationszeit kommt es zu einer konkurrierenden Bindung entsprechend einer Gleichgewichtsreaktion nach dem Massenwirkungsgesetz:

$$\frac{\text{Insulin}}{\text{Insulin-Ak-Komplex}} = \frac{\text{Insulin}^{x}}{\text{Insulin}^{x}\text{-Ak-Komplex}}$$

Nach Einstellung eines Gleichgewichts zwischen markiertem und kaltem Insulin und den Antikörpern gibt man an Dextran gebundene Aktivkohle dazu. Sie hat die Eigenschaft, das nicht an die Antikörper gebundene Insulin zu adsorbieren (Abb. 11 b).
Über andere Methoden und Materialien zur Trennung von Antikörper-gebundenem und freiem Antigen siehe Tabelle 1 sowie Abbildung 11 a - f.

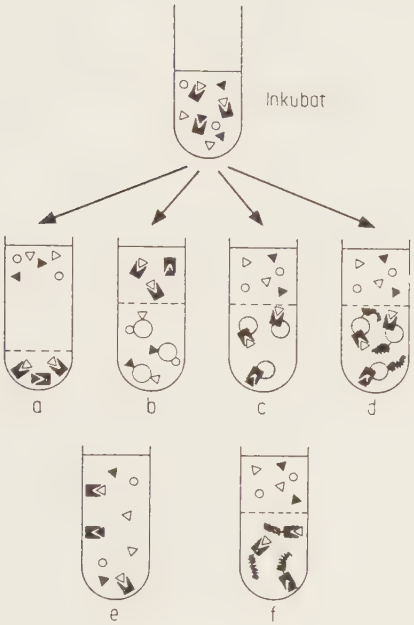


Abb. 11 b: Testprinzip des Schwarz-Mann-RIA
(Aktivkohle-Trennung)
(nach H. G. Eckert)

Trennwirkung	Methode/Material
Verteilung der Komponenten aufgrund unterschiedlicher Beweglichkeit und Molekülgröße	Chromatographie Elektrophorese Gelfiltration Ultrazentrifugation
Fällung des Ag·Ak-Komplexes	Ammoniumsulfat Natriumhydrogensulfit Zirconylphosphat Ethanol 2-Propanol Dioxan Polyethylenglykol (PEG)
Adsorption des Antigens	Aktivkohle (auch an Dextran oder Albumin gebunden) Cellulose Silicate Ionenaustauscher-Harze
Bindung des Antikörpers an eine feste Phase	Antikörper chemisch an polymeren Träger gebunden (ASP) Mit Antikörper adsorptiv beschichtete Teströhrchen („coated tubes") oder Kügelchen
Immunologische Komplexbildung mit einem zweiten Antikörper	Doppelantikörper-Methode (DA) Zweiter Antikörper chemisch gebunden, z. B. an aktivierte Cellulose (Immunosorbens, DASP)

Tab. 1: Trennung von Antikörper-gebundenem und freiem Antigen (nach H. G. Eckert)

Die Radioaktivität des an den Antikörper gebundenen Insulins, das im Überstand bleibt, wird nach Zentrifugieren gemessen. Da die Bindung des radioaktiven Insulins mit zunehmenden Konzentrationen des kalten, zu bestimmenden Insulins verhindert wird, ist die im Szintillationszähler feststellbare Radioaktivität ein Maß für die Menge Insulin in der Probe. Die Radioaktivität des Überstandes steht in einem reziproken Verhältnis zur Antigenkonzentration in der Analysenprobe.
Eine Eichkurve läßt sich dadurch gewinnen, daß eine stets gleiche Menge Antikörper und eine stets gleiche Menge radioaktiven Insulins in mehreren

Ansätzen mit bekannten Standardkonzentrationen kalten Insulins zusammengebracht wird.
Sinn und Zweck der Durchführung eines Insulin-Radio-Immuno-Assay war die Bestimmung der immunologischen Aktivität von mono-, di- und trisubstituiertem Fluorescein-markiertem Rinderinsulin (7, 8, 11). Dabei wurden die drei verschiedenen FTC-Insulin-Konjugate mit RIA-Puffer verdünnt und als genau definierte physiologische Menge in den Immunoassay als Probe eingesetzt. Der Vergleich von eingesetzten und im RIA wiedergefundenen Werten ergab die nach Fluorochrom-Markierung erhaltene Immunkompetenz.
Methodik und wichtigstes immunologisches Material entstammte dem Schwarz-Mann Insulin Radioimmunoassay Kit ^{125}J (23).
Zum Zentrifugieren diente die Sorvall Superspeed RC2-B. Sämtliche Radioaktivitätsmessungen erfolgten im Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Model 3380, eingestellt auf ^{14}C, mit einer konstanten Meßzeit von 2 min je Probengläschen.
Das Radioimmunbesteck Insulin enthält alle für den RIA erforderlichen Reagenzien mit Rinderserumalbumin und Phosphatpuffer stabilisiert und lyophilisiert. Die Lagerfähigkeit des Bestecks wird durch die Haltbarkeit des ^{125}J-Insulins bestimmt (Gamma-Strahler, Halbwertszeit 60 Tage). Die Kapazität des Bestecks entspricht 200 Ansätzen, d. h. bei empfohlenem 2-fachem Ansatz aller Inkubate mindestens 100 Proben.
Die im RIA verwendeten Lyophilisate wurden folgendermaßen aufgelöst:

<u>Insulin-^{125}J</u>

Insulin vom Schwein, ca. 1,25 uCi/Gläschen, in 10 ml sterilem H_2O bidest.

Insulin-Antikörper

Anti-Schweineinsulin-Serum vom Meerschweinchen in 10 ml sterilem H_2O bidest.

Insulin-Standard

Humaninsulin, ca. 1,0 mU/Gläschen, wobei eine internationale Einheit (IE bzw. U) 0,04167 mg des 4. internationalen Standards, einer Mischung aus 52 % Rinder- und 48 % Schweineinsulin, entspricht (26).

a) Humaninsulin-Standardlösung A, 200 uU/ml, in 5 ml sterilem H_2O bidest.

b) Humaninsulin-Standardlösung B, 20 uU/ml: 1 ml Insulin-Standardlösung A in 9 ml RIA-Puffer.

Insulin-Kontrollserum

Insulinhaltiges Humanserum für die Richtigkeitskontrolle, 76 uU/ml, in 5 ml sterilem H_2O bidest.

Rinderserum

150 - 200 mg/Gläschen in 3 ml sterilem H_2O bidest.

Dextran-beschichtete Aktivkohle (1 : 10)

2,5 g/Gläschen in 60 ml kaltem, sterilem H_2O bidest. suspendiert.

Proben

Mono-FTC-Konjugat: 44 uU/ml RIA-Puffer
Di-FTC-Konjugat: 36 uU/ml RIA-Puffer
Tri-FTC-Konjugat: 35 uU/ml RIA-Puffer

Inkubation

Zweckmäßigerweise erfolgen alle Inkubationsansätze zweifach. Dazu werden die Reagenzien in Polystyrolröhrchen (12 x 75 mm) in der Reihenfolge: Puffer, Insulin-Standard bzw. FTC-Insulin-Konjugat bzw. Kontrollserum, Insulin-Antiserum, Tracerhormon, Rinderserum und Dextran-beschichtete Aktivkohle der Tabelle 2 entsprechend pipettiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abgegossen und seine Radioaktivität im Gammaprobenwechsler gemessen.

Ansatz-Nr.	Bezeichnung	Puffer (ul)	Insulin-Standard (ul)	Probe (ul)	Insulin-Anti-serum (ul)	Tracer-Hormon (ul)	Inkubation	RS (ul)	DBA (ml)	Zentrifu-gieren
1 + 2	Blank	800				100	Alle	100	0,5	Alle
3 + 4	0-Standard	800	0		100	100	Ansätze	100	0,5	Ansätze
5 + 6	Standard 1	800	25 B		100	100	bei	100	0,5	15 min mit
7 + 8	Standard 2	800	50 B		100	100	+2°C-	100	0,5	1240 g
9 + 10	Standard 3	800	100 B		100	100	+8°C	100	0,5	zentrifu-
11 + 12	Standard 4	800	150 B		100	100	4,5 h	100	0,5	gieren
13 + 14	Standard 5	800	25 A		100	100	stehen	100	0,5	
15 + 16	Standard 6	800	50 A		100	100	lassen	100	0,5	
17 + 18	Standard 7	800	100 A		100	100		100	0,5	
19 + 20	M-FTC-I	800		100	100	100		100	0,5	
21 + 22	D-FTC-I	800		100	100	100		100	0,5	
23 + 24	T-FTC-I	800		100	100	100		100	0,5	
25 + 26	Kon-Ser	800		100	100	100		100	0,5	

Tab. 2: RIA-Inkubationsschema

Auswertung

a) Präparation der Standardkurve

Die Standardkurve wird durch Verwendung von 7 Standards erstellt. Der Kurvenbereich erstreckt sich dabei von 5 uU/ml - 200 uU/ml (0,21 ng/ml - 8,3 ng/ml).

Zunächst subtrahiert man von jeder gemittelten Zählrate (CPM) die gemittelte Zählrate des Blanks. Man erhält die Mittelwert-Korrigierten-CPM (MK-CPM).

Der zweite Schritt ist die Berechnung des gebundenen Anteils jeder Konzentration nach folgender Formel:

$$\% \frac{B}{B_o} = \frac{\text{Standard MK-CPM}}{\text{Null-Standard MK-CPM}} \times 100$$

Als nächstes trägt man diese Werte auf semilogarithmisches Papier.

Abszisse: logarithmische Skala - Konzentration uU/ml

Ordinate: lineare Skala - % gebunden.

Die resultierende Kurve dieser Punkte ist nicht linear, sondern sigmoid (Abb. 12).

b) Ergebnis unbekannter Proben

Zur Berechnung der Fraktion % gebunden der Kontrollen und Proben verwendet man folgende Formeln:

$$\text{Kontrolle \% gebunden} \quad \frac{\text{Kontrolle MK-CPM}}{\text{Null-Standard MK-CPM}} \times 100$$

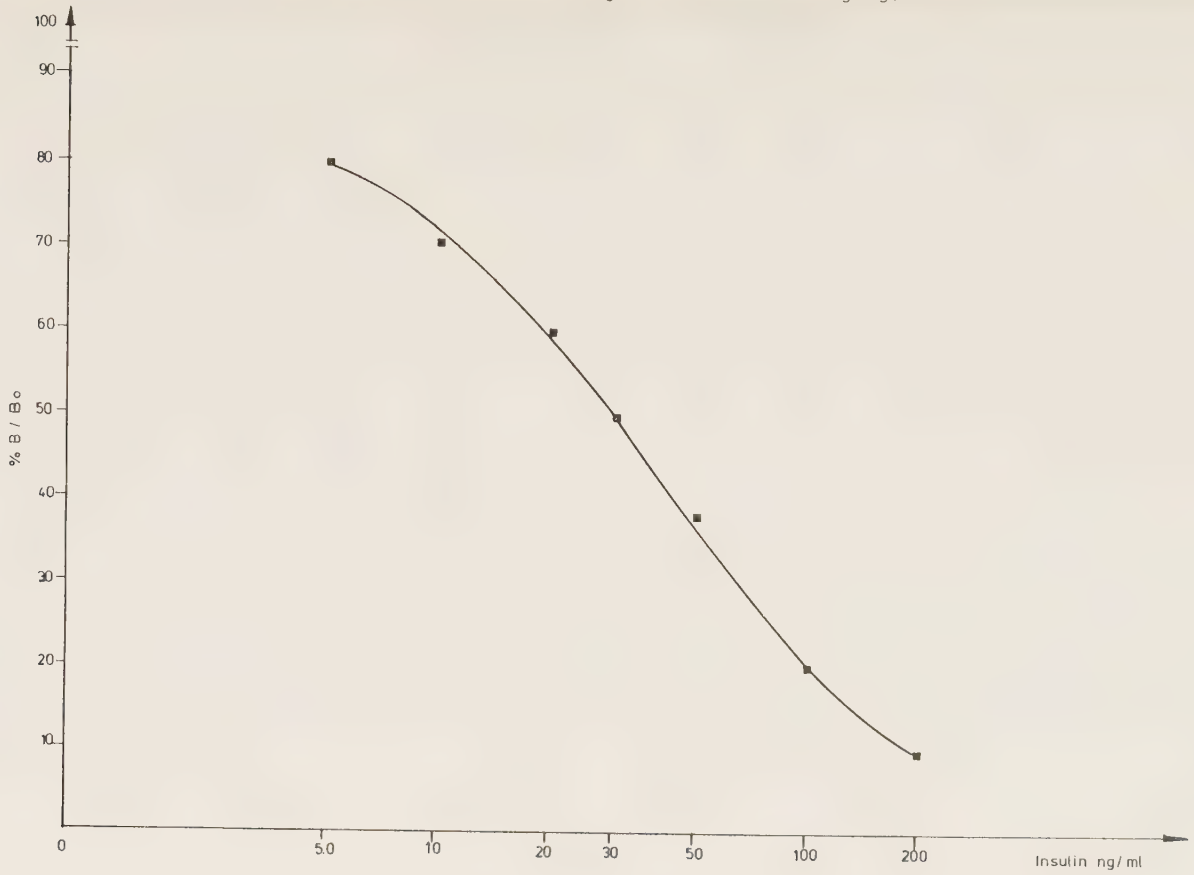
$$\text{Probe \% gebunden} = \frac{\text{Probe MK-CPM}}{\text{Null-Standard MK-CPM}} \times 100$$

Durch Interpolieren der Werte % gebunden aus der Standardkurve erhält man die Insulinkonzentrationen in uU/ml von Probe bzw. Kontrollserum.

c) Alternative Berechnungsmethode

Eine Möglichkeit zur Linearisierung der Standardkurve ist die Logit-Log-Auftragung. Sie erlaubt eine statistische Analyse der Werte, indem man die relative Summenhäufigkeit der Meßwerte gegen den Logarithmus der Konzentration aufträgt (27). Auf Logit-Log-Papier trägt man in die Ordinate % gebunden und in die logarithmische Abszisse die Konzentration. Danach zieht man eine Gerade durch die Punkte und liest wie üblich unter Verwendung der Probendaten % gebunden aus der Darstellung ab (Abb. 13).

Abb. 12: Sigmoide RIA-Standardkurve (semilogarithmische Auftragung)



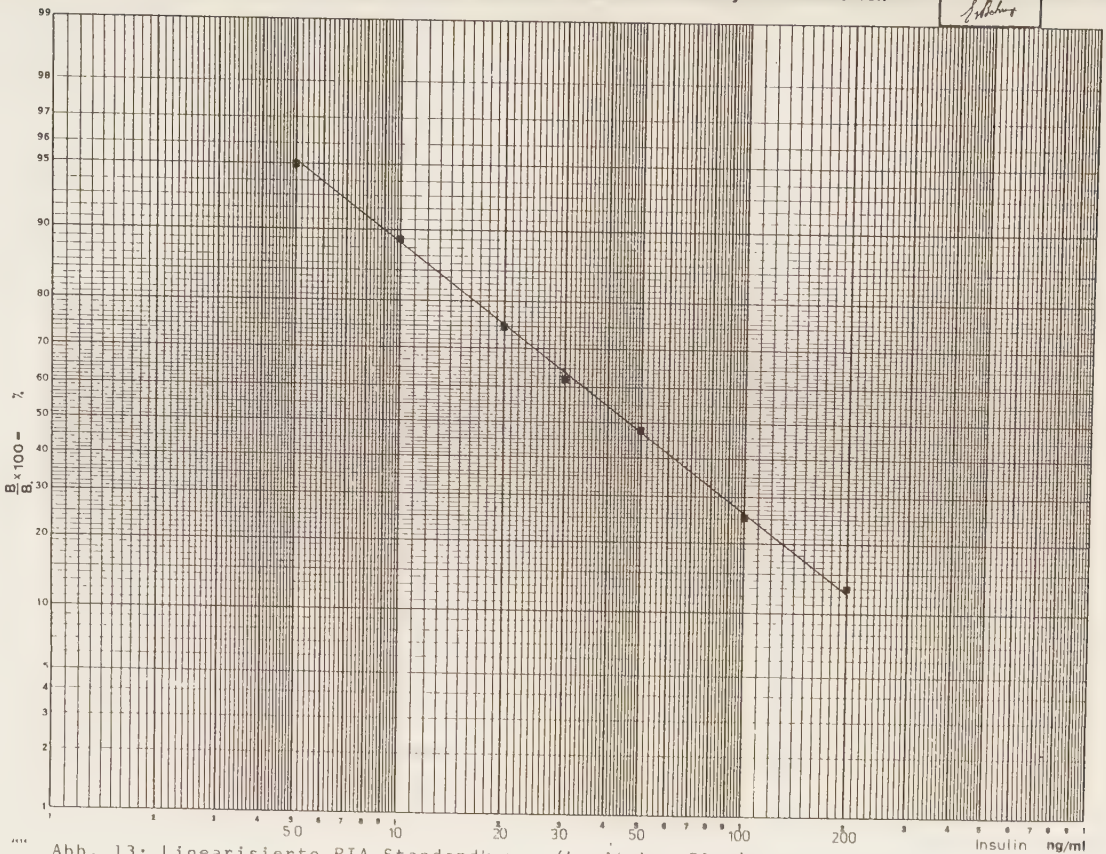


Abb. 13: Linearisierte RIA-Standardkurve (Logit-Log-Plot)

9. Kopplung von Anti-Rinderinsulin-Antikörper an Cellulose

Cellulose wird mit Bromcyan aktiviert. Im Anschluß daran wird der Antikörper an das reaktive Polymer kovalent gebunden (28, 29, 30, 31).
Die Reaktion ist in Abbildung 14 dargestellt.

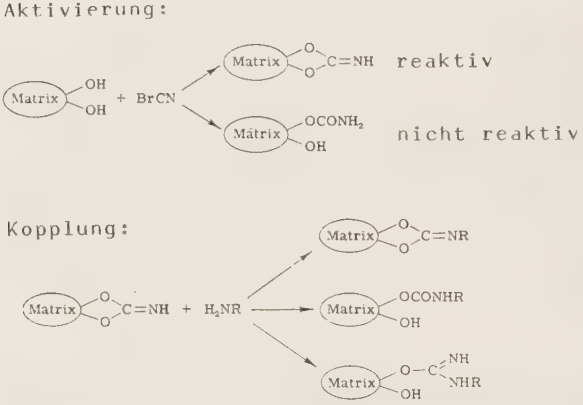


Abb. 14: Bromcyan-aktivierte Proteinkopplung

Trägermaterial: Cellulose Schleicher-Schüll Blauband Nr. 589[3]

Antikörper: Anti-Rinderinsulin vom Meerschweinchen, lyophilisiert, mit einer Insulinbindungskapazität von 0,75 U

Aus Cellulosefilter wurden Plättchen mit einem Durchmesser von 5 mm gestanzt. 50 Celluloseplättchen (100 mg) wurden in 5 ml H_2O bidest. suspendiert und gerührt, damit sie nicht verkleben. Nach dem Lösen von 400 mg BrCN in 400 mg Dioxan wurde diese Lösung zur Plättchen-Suspension gegeben (Abzug) und die Cellulose-Plättchen unter Rühren 10 min bei 10°C aktiviert.

Der pH-Wert wurde dabei durch Zugabe von 2 M NaOH zwischen 10,5 und 11,0 gehalten.

Die Plättchen wurden anschließend mit eisgekühltem 0,1 M $NaHCO_3$/0,14 M NaCl, pH 8,5 (Kopplungspuffer) gewaschen bis der BrCN-Geruch verschwand.

Nun wurden 0,5 ml der in 2,5 ml Kopplungspuffer rekonstituierten Anti-Rinderinsulin-Lösung dazugegeben und mit weiterem Kopplungspuffer auf 5 ml aufgefüllt.

Die Inkubation erfolgte bei RT 20 h auf dem Schüttler, anschließend wurde wiederum mit eisgekühltem Kopplungspuffer gewaschen. Die Desaktivierung der BrCN-aktivierten, jedoch nicht gekoppelten Cellulose-Hydroxylgruppen (freie Imidocarbonatgruppen) erfolgte bei RT 4 h auf dem Schüttler mit 10 ml 0,5 M Äthanolamin in 2%iger $NaHCO_3$-Lösung, pH 9,0.

Die Plättchen wurden abfiltriert, mit je 100 ml eisgekühlter Saline und H_2O bidest. gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet.

Ihre Aufbewahrung erfolgte im Exsikkator über Silicagel. Bei Zugabe von 0,5 ml Antikörperlösung (0,15 U = 6,25 ug Insulinbindungskapazität) ergibt sich bei einer Kopplung von 50 Plättchen eine theoretische Insulinbindungskapazität von 125 ng pro Plättchen.

10. Inkubation von Antikörper-gekoppeltem Träger mit fluoreszenzmarkiertem Insulin

Dieser Versuch diente dazu, die Mono-FTC-Insulinbindungskapazität eines Insulinantikörper-gekoppelten Celluloseplättchens zu ermitteln.
Bei der Zugabe von an Trägermaterial gekoppeltem Antikörper zu der Antigen-Lösung reagieren beide miteinander und der Inkubationslösung wird Insulin entzogen. Es wird der im Überstand verbliebene Rest des markierten Insulins gemessen (32), bzw. diejenige Anzahl an Antikörper-beladenen Cellulose-Plättchen bestimmt, die notwendig ist, um die bei der Inkubation mit einer definierten Menge an Mono-FTC-Insulin vorhandene Fluoreszenz im Überstand auf Null zu senken.

In 6 Polystyrolröhrchen wurden je 1 Cellulose-Plättchen und 250 ul einer mit FIA-Puffer entsprechend verdünnten Mono-FTC-Insulin-Lösung mit einer Ausgangskonzentration von 175 ng/250 ul gegeben (Tab. 3).

ng FTC-Insulin/ Ansatz	≙ Plättchenzahl Ak-beladen	Ü $FE_{sens\ 10}$
175	0 (B1)	92
175	1	86
175 (Puffer 1:1)	2	77,5
175 (Puffer 1:2)	3	65
175 (Puffer 1:4)	5	52,5
175 (Puffer 1:9)	10	15

Tab. 3: Bestimmung der Antigenbindungskapazität der Cellulose-Plättchen

Die Röhrchen wurden verschlossen und vor Licht geschützt bei RT 20 h auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml Überstand entnommen, mit 1,8 ml FIA-Puffer versetzt und in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke bei RT im Fluorimeter gemessen. Beim Blank (Bl) wurde mit unbeladenem Träger und unverdünnter Konjugatlösung (175 ng/250 ul) inkubiert.

11. Dissoziierung des Antikörper-Insulin-Komplexes

Nach Dandliker et al. (33) gibt es ganz bestimmte Ionen (sog. chaotrope Ionen), welche primäre Antigen-Antikörperkomplexe dissoziieren, ohne dabei die funktionelle Aktivität des Antikörpers zu verändern. In Reihenfolge mit abnehmender Wirkung sind dies:
Thiocyanat - Perchlorat - Jodid.

Um das Dissoziat aus den durchgeführten Ansätzen zu gewinnen, wurden zunächst aus den Polystyrolröhrchen die Inkubatüberstände mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und jedes Röhrchen in Abständen von 10 min mit 2,5 ml 0,85 % NaCl 3mal gewaschen. Nach Zugabe von 250 ul 3 M NaSCN zu den Plättchen wurden die Röhrchen verschlossen und lichtgeschützt bei RT auf dem Schüttler 30 min inkubiert.
Zur Messung der Fluoreszenz im Dissoziat wurden wiederum 0,2 ml entnommen und mit 1,8 ml FIA-Puffer verdünnt.

C Ergebnisse

1. Bestimmung des molaren Fluorescein-Protein-Verhältnisses

Nach der Methode von Lowry et al. (12) wurde die Proteinkonzentration C_p (mg Protein/ml Konjugat) unter Bezugnahme auf eine 0,1%ige Rinderserumalbuminlösung bestimmt (Tab. 4).

FTC-Insulin	C_p (mg/ml)	E_{490}	$C_{FITC\ protgeb.}$ (ug/ml)	F/P (M)
Mono-	1,47	0,93	100,2	1,003
Di-	0,76	0,97	104,5	2,02
Tri-	0,44	0,80	86,2	2,88

Tab. 4: Bestimmung des molaren F/P-Verhältnisses

Die Bestimmung der proteingebundenen FITC-Konzentration $C_{FITC\ protgeb.}$ (ug/ml Konjugat) erfolgte mittels des Extinktionskoeffizienten bei 490 nm nach der Beziehung:

$$C_{FITC\ protgeb.}\ (ug/ml) = \frac{E_{490} \times \text{Verdünnung}}{0,195} \quad (18, 19)$$

Das molare F/P-Verhältnis F/P (M) wurde wie folgt berechnet:

$$F/P\ (M) = \frac{C_{FITC}}{C_{Insulin} \times 1000} \times \frac{\text{MG Insulin}}{\text{MG FITC}} \quad (18, 34, 35)$$

Der molare F/P-Quotient von 1,003 für das Mono-FTC-Insulin bedeutet, daß bei einer 100%igen Konjugationsreaktion 68,1 ug FITC mit 1 mg Insulin umgesetzt werden müssen (18).

2. Radioimmunologische Aktivitätsbestimmung von mono-, di- und tri-konjugiertem Fluoresceinthiocarbamyl-Insulin

Im vorliegenden Versuch wurde, wie bereits in Kapitel B II 8 beschrieben, die Immunkompetenz von mono-, di- und trisubstituiertem FTC-Insulin ermittelt (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).
Entsprechend dem in Tab. 2 aufgezeigten Inkubationsschema, erhielt man bei zwei unabhängig voneinander ausgeführten RIAs folgende zwei Wertetabellen (Tab. 5, 6).
Der Wertetabelle des RIA Nr. 1 (Tab. 5) entspricht die semilogarithmisch aufgetragene Standardkurve der Abb. 15.
Die als Logit-Log-Plot aufgetragenen Werte des RIA Nr. 2 (Tab. 6) bestimmen die Eichgerade in Abb. 16.

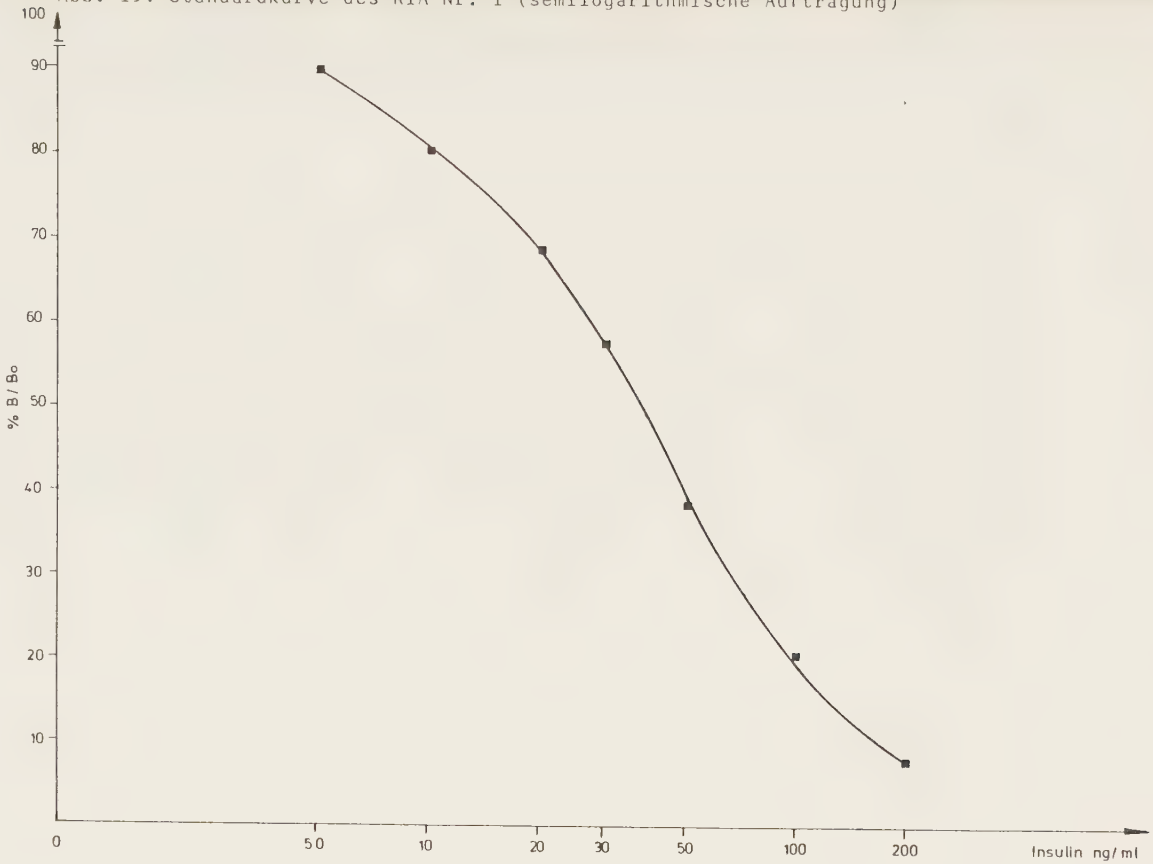
In die beiden RIAs wurden folgende Probekonzentrationen eingesetzt:

Mono-FTC-Insulin:	44 uU/ml
Di-FTC-Insulin:	36 uU/ml
Tri-FTC-Insulin:	35 uU/ml
Kontrollserum:	76 uU/ml (mittlere Insulinkonzentration)

Ansatz-Nr.	Bezeichnung	CPM	Mittelwert-CPM	MK-CPM	% B/B_o	Insulin (uU/ml)	Immunologische Aktivität (%)
1 2	Blank	619 621	620				
3 4	0-Standard	3841 3792	3816	3196			
5 6	Standard 1	3515 3482	3498	2878	90,1	5	
7 8	Standard 2	3290 3165	3227	2607	81,6	10	
9 10	Standard 3	2868 2777	2822	2202	68,9	20	
11 12	Standard 4	2544 2431	2487	1867	58,4	30	
13 14	Standard 5	1936 1799	1867	1247	39,0	50	
15 16	Standard 6	1329 1248	1288	668	20,9	100	
17 18	Standard 7	908 851	879	259	8,1	200	
19 20	M-FTC-I	1927 2021	1974	1354	42,4	46	104
21 22	D-FTC-I	2849 2699	2774	2154	67,4	21	58
23 24	T-FTC-I	3210 3244	3227	2607	81,6	10	28
25 26	Kon-Ser	1561 1475	1518	898	28,1	72	

Tab. 5: RIA Nr. 1

Abb. 15: Standardkurve des RIA Nr. 1 (semilogarithmische Auftragung)



Ansatz-Nr.	Bezeichnung	CPM	Mittelwert-CPM	MK-CPM	% B/B_o	Insulin (uU/ml)	Immunologische Aktivität (%)
1 2	Blank	1260 1305	1282				
3 4	0-Standard	5825 6350	687	4805			
5 6	Standard 1	5385 5915	5650	4368	90,9	5	
7 8	Standard 2	4965 5485	5225	3943	82,1	10	
9 10	Standard 3	4505 4600	4552	3270	68,1	20	
11 12	Standard 4	3833 4315	4085	2803	58,3	30	
13 14	Standard 5	3090 3255	3172	1890	39,3	50	
15 16	Standard 6	2285 2365	2325	1043	21,7	100	
17 18	Standard 7	1610 1675	1642	360	7,5	200	
19 20	M-FTC-I	3285 3489	3387	2105	43,8	44	100
21 22	D-FTC-I	4845 4539	4692	3410	71,0	17	47
23 24	T-FTC-I	5235 5259	5247	3965	82,5	9,5	27
25 26	Kon-Ser	2735 2903	2819	1537	32,0	70	

Tab. 6: RIA Nr. 2

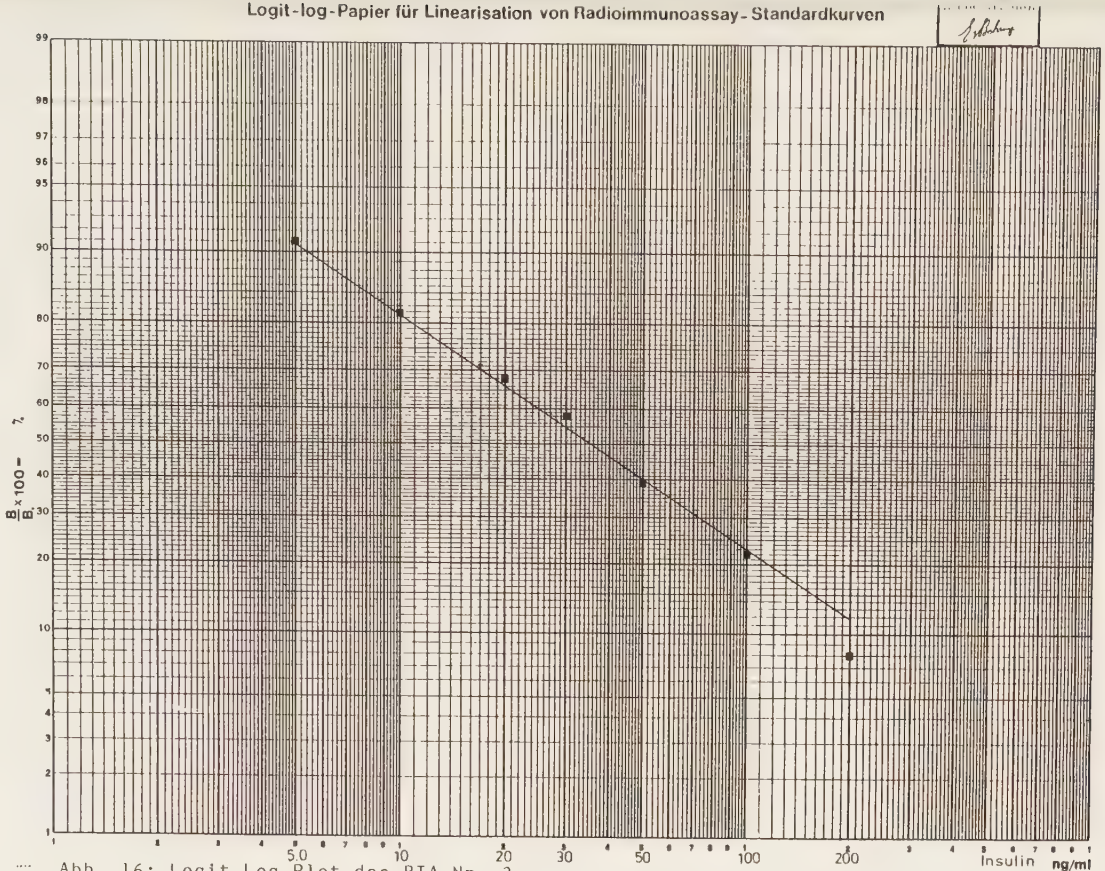


Abb. 16: Logit-Log-Plot des RIA Nr. 2

Vergleicht man die in die beiden RIAs eingesetzten bekannten Probenmengen mit den aus den Standardkurven ermittelten Werten, so ergeben sich für die verschiedenen FTC-Insulin-Konjugate die aus den Tab. 5, 6 zu entnehmenden prozentualen immunologischen Aktivitäten:

$$\% \text{ immunolog. Aktivität} = \frac{\text{aus St.K. ermittelter Wert}}{\text{eingesetzte Probenmenge}} \times 100$$

für das Mono-Konjugat also:

$$\frac{46,0}{44,0} \times 100 = 104\ \% \text{ bzw. } \frac{44}{44} \times 100 = 100\ \%$$

Entsprechendes gilt für das Di-Konjugat mit 58 % bzw. 47 % und für das Tri-Konjugat mit 28 % bzw. 27 % Immunkompetenz.
Die für das Kontrollserum aus den Standardkurven ermittelten Konzentrationen von 72 uU/ml bzw. 70 uU/ml befanden sich mit ihren Werten eindeutig im 2s Streubereich (58 uU/ml - 88 uU/ml) der eingesetzten mittleren Insulinkonzentration von 76 uU/ml.

Dieses Ergebnis bedeutet, daß monosubstituiertes, fluoresceinmarkiertes Insulin seine volle immunologische Wirkung behält (11). Deshalb scheint es für fluoreszenzimmunologische Untersuchungen am besten geeignet.
Im Gegensatz zu den von Bromer et al. (7, 8) beschriebenen Ergebnissen, tritt beim Di-FTC-Insulin ein immunologischer Wirkungsverlust von etwa 50 % ein, während die immunologische Aktivität des Tri-FTC-Insulins noch knapp ein Drittel der ursprünglichen Aktivität beträgt.

3. Proteinbestimmung der Antikörper-Lösung

Die von Kollaschinski (36) nach der Methode von Lowry et al. durchgeführte Proteinbestimmung des zur Kopplung an Cellulose verwendeten Antikörpers ergab einen Wert von 24 mg/ml.
Das Anti-Rinderinsulin-Lyophilisat wurde in 2,5 ml Kopplungspuffer gelöst und hatte eine Insulinbindungskapazität von 0,75 U (31,25 ug Insulin).
Zur Kopplung von Antikörper an Cellulose wurden davon 0,5 ml verwendet.
Dies entspricht einer theoretischen Insulinbindungskapazität von 0,15 U (6,25 ug Insulin) pro 50 Cellulose-Plättchen bzw. 125 ng Insulin pro 1 Plättchen.

4. Proteinbestimmung der Antikörper-gekoppelten Cellulose-Plättchen

50 Cellulose-Plättchen wurden mit 0,5 ml der Antikörperlösung gekoppelt. Da in 0,5 ml 12 mg Protein enthalten sind, ergibt dies bei einem Ansatz von 50 Plättchen ein Angebot von 240 ug Protein pro Plättchen.
Die Proteinbestimmung mit der Ninhydrin-Methode nach saurer Totalhydrolyse lieferte einen Wert von 30 ug Protein pro Plättchen.
Dieses Ergebnis bedeutet, daß bei der Kopplung nur $\frac{30}{240} \times 100 = 12{,}5$ % des vorhandenen Proteins an die Cellulose-Plättchen gebunden wurden.
Somit betrug die tatsächliche Insulinbindungskapazität nicht wie vorher berechnet 125 ng, sondern nur 15,6 ng/Plättchen.

5. Bestimmung verschiedener Einflüsse auf die Fluoreszenzmessung

In diesen von Kollaschinski et al. (36) durchgeführten Untersuchungen sollte die Wirkung

a) des FIA-Puffers
b) der Cellulose-Plättchen
c) der zeitlichen Differenz zwischen Entnahme der Probe und der Messung und
d) des Rhodanids

auf die Fluoreszenzausbeute bestimmt werden. Ferner wurde die Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Inkubation bzw. Dissoziation sowie das unspezifische Bindungsverhalten der Plättchen untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden dabei festgestellt:

a) Bei Verzicht auf den albuminhaltigen FIA-Puffer ist die Fluoreszenzausbeute deutlich geringer. Ein Eiweißüberschuß im Puffer ist notwendig, um die Proteinbindungskapazität der Gefäßwand abzusättigen (37).
b) In geringen Konzentrationen bis 275 ng pro Ansatz (1100 ng/ml) erfolgte keine nennenswerte unspezifische Bindung an die Cellulose-Plättchen.
c) Die Fluoreszenz in der Probe bleibt bis zur Messung mindestens 2 h konstant.
d) Mit steigender Rhodanidkonzentration sinkt die Fluoreszenzausbeute sehr stark ab. Bei Zusatz von 3 M NaSCN (zur Gewinnung des Dissoziates) bleiben nur noch 60 % der anfänglichen Fluoreszenzausbeute übrig. Die Fluoreszenzeinheiten des Dissoziates müssen deshalb mit dem Faktor $\frac{100}{60} = 1{,}67$ multipliziert werden.

e) Die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper läuft bei RT schneller ab. Gleiches gilt für die Dissoziation. Bei $4^{o}C$ findet man in vergleichbarer Zeit weniger FTC-Insulin an die Plättchen gebunden.

f) Bei RT wird der Endwert der Reaktion nach 16 h Inkubation erreicht, gegenüber 72 h Inkubation bei $4^{o}C$.

g) Bei der Dissoziation wird erst nach 30 min Inkubation mit Rhodanid die maximale Fluoreszenzausbeute erzielt.

h) Bis zu einer Protein-Konzentration von 4400 ng/ml ist die unspezifische Bindung an Cellulose-Plättchen gering.

Diese Ergebnisse wurden bei den Versuchsbedingungen des in Kapitel C 8 beschriebenen Fluoreszenz-Immuno-Kompetitions-Assays in entsprechender Weise berücksichtigt.

6. Bestimmung der Antigenbindungskapazität der Plättchen

Die Bindungskapazität der Plättchen für Mono-FTC-Insulin wurde mit der in Kapitel B II 10 beschriebenen Methode und den in Tab. 3 enthaltenen Werten bestimmt. Für den Blank wurde ein unbeladenes Plättchen mit 175 ng Mono-FTC-Insulin inkubiert.
Ausgewertet wurden 6 Versuchsansätze.

Die Überstandkurve in Abb. 17 stellt eine lineare Regressionslinie dar. Sie schneidet die Abszisse bei Plättchenzahl 12, d. h. 1 Plättchen bindet $\frac{175\ ng}{12} = 14{,}6$ ng Protein. Dieser Wert stimmt fast exakt mit der Insulinbindungskapazität der Plättchen von 15,6 ng überein.

Folglich besitzt das Mono-FTC-Insulin die gleiche Immunkompetenz wie das nichtkonjugierte Insulin.

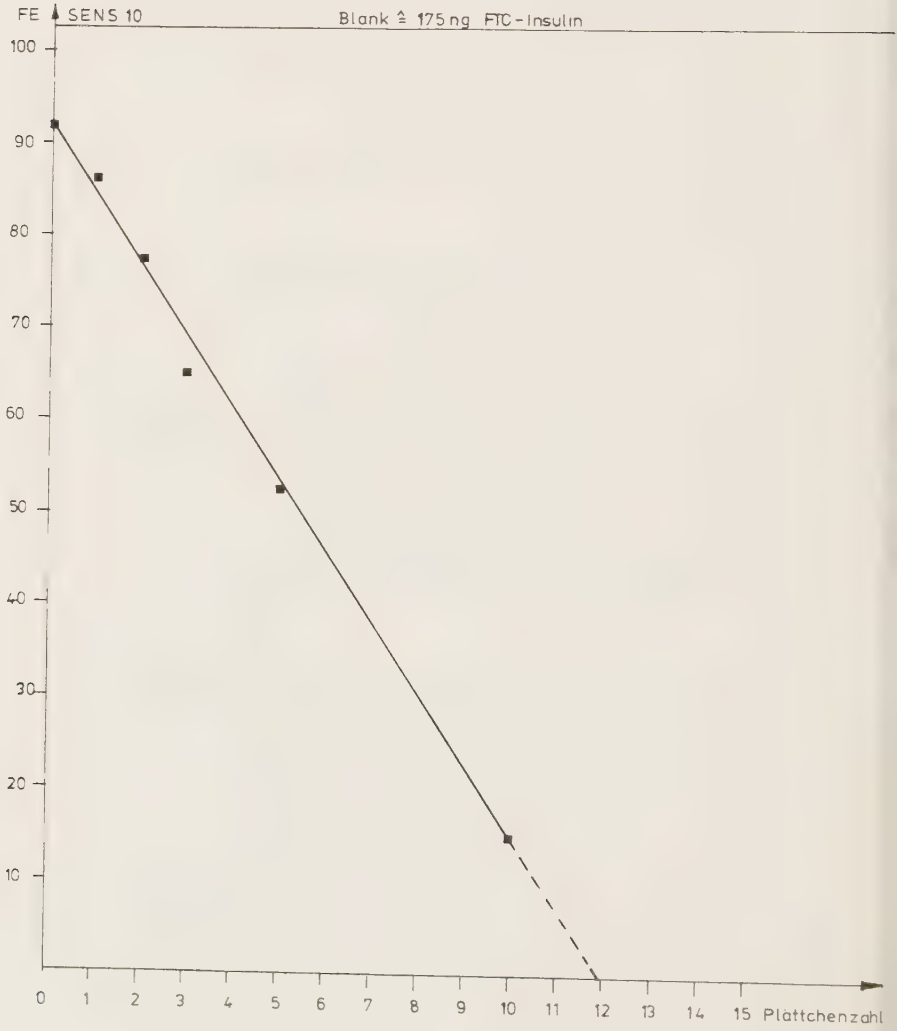


Abb. 17: Bestimmung der M-FTC-I-Bindungskapazität der Plättchen

7. Ansatz für einen Fluoreszenz-Immuno-Kompetitions-Assay

Es wurden 3 Teströhrchen angesetzt (Tab. 7).
Durch Inkubation mit unbeladenem Cellulose-Plättchen (Blank) wurde die Kontrolle über die maximal zu erwartende Fluoreszenzausbeute im Überstand (100 % Wert; F_{100}) durchgeführt (Ansatz 1).
Durch Ermittlung der Fluoreszenz im Überstand nach Inkubation eines beladenen Cellulose-Plättchens mit einer standardisierten Menge Mono-FTC-Insulin (I^x) und in Abwesenheit von unmarkiertem Insulin (Nullstandard, Ansatz 2) erhält man die apparente Bindungskapazität des Cellulose-Plättchens (P).
Vergleicht man nun die Kompetition mit unmarkiertem Insulin (I) um denselben Antikörper (Ansatz 3), so erhöht sich die Fluoreszenz im Überstand auf

$$\frac{I^x - P}{I^x + I} \times F_{100} + \frac{I}{I^x + I} \times F_{100}$$

Im Ansatz 3 wurden 33 Fluoreszenzeinheiten (FE) im Überstand gemessen. Die Berechnung unter Berücksichtigung von Ansatz 1 und Ansatz 2 läßt einen Betrag von

$$\frac{35 - 23{,}3}{35 + 24} \times 57 \text{ FE} + \frac{24}{35 + 24} \times 57 \text{ FE} = 34 \text{ FE}$$

erwarten.
Dieses Ergebnis weicht nur um 3 % vom berechneten Wert ab. Es kann daraus wieder auf eine 100%ige Kreuzreaktion zwischen fluoreszenzmarkiertem und unmarkiertem Insulin geschlossen werden. Für die Berechnung wurde die aus Ansatz 2 ($I = 0$; $I^x = 35$ ng) ermittelte apparente Plättchenbindungskapazität zugrunde gelegt.

Im Dissoziat wurde der Nullstandard (100 % Wert) zu 25 FE bestimmt.

Ansatz-Nr.	Bezeichnung	Puffer (ul)	Insulin-Standard ng/100ul	Insulin-Ak	M-FTC-I ng/150ul	Inkubation	FE_{sens30} Ü	Dissoziation	FE_{sens30} D
1	Blank	100		θ	35	20 h bei	57	Überstand	0
2	0-Standard	100		θ	35	RT und	19	absaugen,	25
3	Kompetition		24	θ	35	mäßigem	33	waschen.	18
						Schütteln		Zugabe v.	
								250 ul	
								3 M NaSCN.	
								30 min bei	
								RT und	
								leichtem	
								Schütteln	
								inkubieren	

θ ≙ unbeladenes Cellulose-Plättchen
θ ≙ Ak-beladenes Plättchen

Tab. 7: Ansatz eines FIKA
Inkubationsschema

Davon sollten beim Kompetitionsversuch (Ansatz 3) im Dissoziat noch

$$\frac{35\ FE}{35\ FE + 24\ FE} \times 100 = 59\ \%$$

vorhanden sein.
Der tatsächliche Wert betrug jedoch 18 FE (72 %). Die Differenz hierfür dürfte in einem Fluoreszenzverlust im Dissoziat des Nullstandards zu suchen sein.

8. Fluoreszenz-Immuno-Kompetitions-Assay mit konstanter Konzentration markierten Insulins und variablen unmarkierten Insulinkonzentrationen

Zu einer konstanten Menge Mono-FTC-Insulin (35 ng/150 ul) wurden 100 ul unmarkiertes Insulin in variablen Konzentrationen gegeben. Der Ansatz erfolgte wiederum mit 15 ng-Plättchen (Tab. 8). Die Bestimmung der Maximalfluoreszenz im Überstand (100 % Wert) erfolgte durch Inkubation mit unbeladenen Cellulose-Plättchen (Blank), die des 100 % Wertes im Dissoziat ohne Zugabe von Insulin (Nullstandard) zur beladenen Cellulose (Tab. 9).

Abb. 18 zeigt das Ergebnis in linearer Abhängigkeit vom %-Gehalt des an den Antikörper gebundenen unmarkierten Insulins.

Eine Möglichkeit zur Linearisierung der Meßwerte stellt die in Kapitel B II 8 beschriebene und sehr häufig bei Kompetitions-Assays dieser Art verwendete Logit-Log-Auftragung dar (Abb. 19).

Ansatz-Nr.	Bezeichnung	Puffer (ul)	Insulin-Standard ng/100ul	Insulin-Ak	M-FTC-I ng/150ul	Inkubation	FE_{sens30} MW Ü	Dissoziation	FE_{sens30} MW D
1 + 2	Blank	100		θ	35	20 h bei	45	Überstand	0
3 + 4	0-Standard	100		θ	35	RT und	21	absaugen,	26
5 + 6	Standard 1		12	θ	35	mäßigem	24	waschen.	19
7 + 8	Standard 2		24	θ	35	Schütteln	28	Zugabe v.	17
9 + 10	Standard 3		48	θ	35		33	250 ul	13
11 + 12	Standard 4		72	θ	35		37	3 M NaSCN. 30 min bei RT und leichtem Schütteln inkubieren	10

θ ^ unbeladenes Cellulose-Plättchen

θ ≙ Ak-beladenes Plättchen

Tab. 8: FIKA-Inkubationsschema

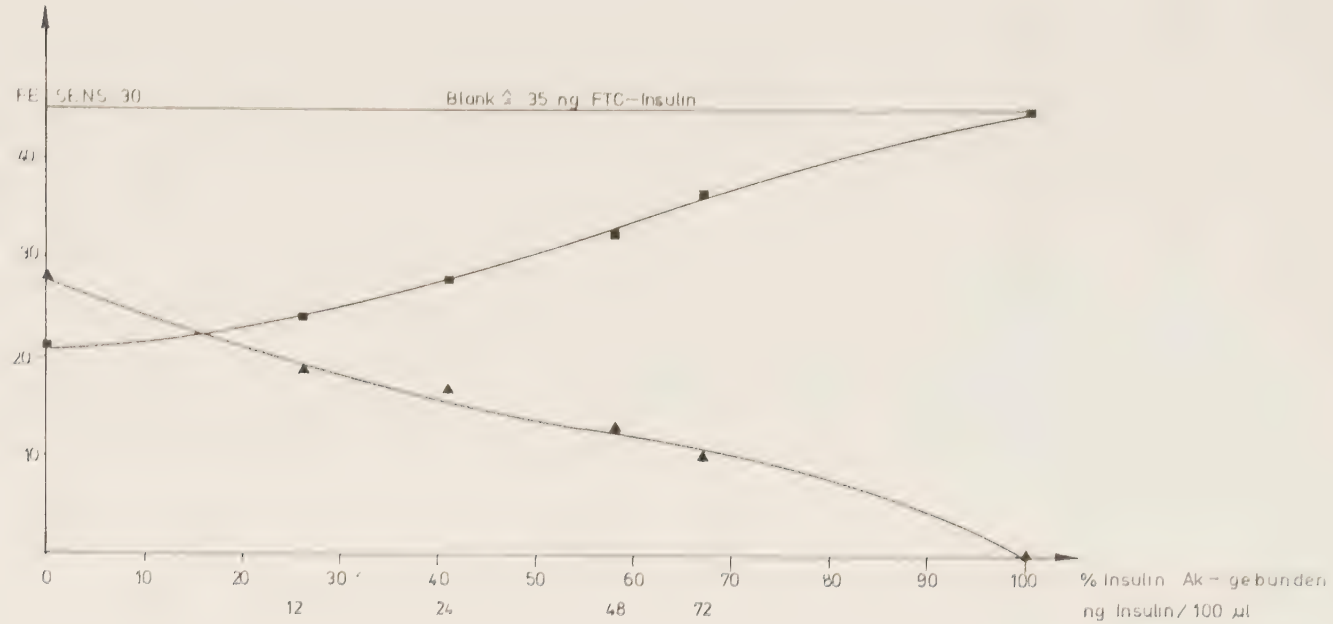
Insulin ng/100ul	% Insulin Ak-geb.	FE_{sens30} (MW) Ü	% Blank Ü	FE_{sens30} (MW) D	% Blank D	$\sum$ % D 26 = 100 %
Bl	100	45	100	0	0	
0	0	21	47	26	58	100
12	26	24	53	19	42	73
24	41	28	62	17	37	65
48	58	33	73	13	29	50
72	67	37	82	10	22	38

Tab. 9: FIKA mit konstanter FTC-Insulin-Konzentration und variablen unmarkierten Insulin-Konzentrationen

Abb. 18: FIKA mit konstanter FTC-Insulin-Konzentration und variablen unmarkierten Insulin-Konzentrationen

B ■——■

B ▲——▲ (B nicht korrigiert)



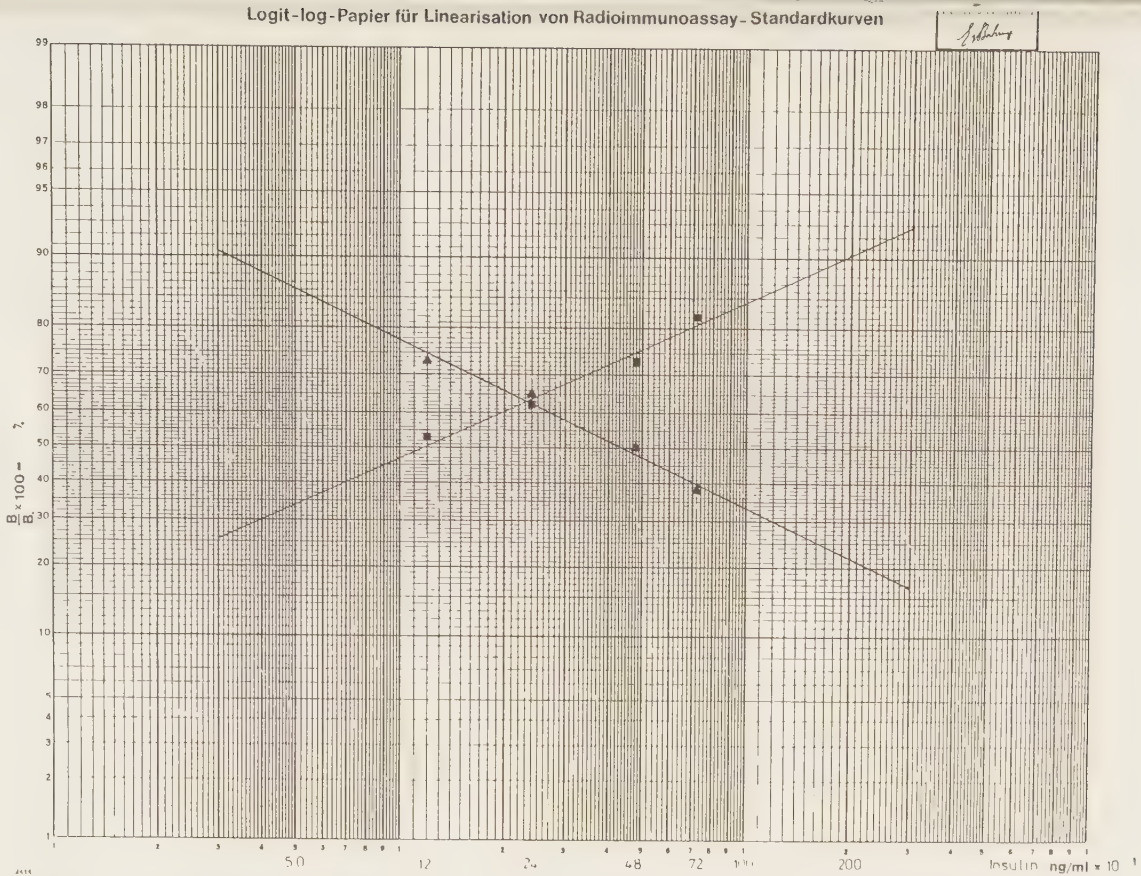


Abb. 19: Logit-Log-Plot des FIKA J ■——■ D ▲——▲ (D nicht korrigiert)

D Diskussion und Zusammenfassung

Die quantitative Bestimmung von biologisch aktiven Substanzen im Blutplasma und anderen Körperflüssigkeiten kann durch eine Vielzahl immunologischer Methoden geschehen. Radioimmunologische Methoden und Enzymimmunoassays sind im Augenblick die empfindlichsten Techniken, die routinemäßig für die Bestimmung von Peptidhormonen, Nicht-Peptidhormonen und nicht-hormonalen Stoffen angewendet werden. Sie besitzen die Spezifität immunologischer Reaktionen und die Indikations-Empfindlichkeit radioaktiv- bzw. enzymmarkierter Moleküle. Aber auch fluoreszierende Verbindungen lassen sich anstelle der Radionuklide und Enzyme als Indikatoren verwenden.
Der von Coons et al. (38, 39) eingeführte Nachweis von Fluoreszenz an Gewebeschnitten und Zellen ist die klassische Methode des Immunfluoreszenztests. Modifikationen dieser Methode machten die quantitative Bestimmung von Antigenen und Antikörpern in Lösung möglich.
Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Substanzen wurde zum ersten Mal von Aalberse (32) für die Quantifizierung von Immunglobulin G beschrieben und von Haaijman et al. (40) zu einem Fluoreszenz-Immuno-Kompetitions-Assay weiterentwickelt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer Bestimmungsmethode für Insulin auf der Basis eines nichtisotopischen Fluoreszenz-Immuno-Assays. Dieser wurde in Form einer kompetitiven Proteinbindungsanalyse durchgeführt:

Entsprechend dieser Beziehung waren als Voraussetzungen zum Aufbau eines fluoreszenzimmunologischen Meßsystems - neben unmarkiertem Insulin und Antiserum mit spezifischen Antikörpern - die Präparation eines hochgereinigten, immunologisch identischen Fluoreszenz-Markers sowie ein geeignetes Verfahren zur Trennung des freien vom antikörpergebundenen Antigen notwendig.
Insulin wurde nach der Methode von Bromer et al. (8, 41) mit dem proteinreaktiven Fluorochrom FITC (Molverhältnis Insulin: FITC = 1 : 2) markiert. Die Auftrennung des Konjugat-Gemisches in der PVC-Träger-Elektrophorese (21, 22) machte eine wesentliche Vereinfachung der FTC-Insulin Fraktionierung bei gleichzeitiger Optimierung der Qualität in einem einzigen Verfahrensschritt möglich. Als Qualitätskriterien des hochgereinigten Konjugates galten dabei die Ermittlung optimaler F/P Quotienten für die elektrophoretisch getrennten Mono-, Di- und Tri-FTC-Insuline sowie das Fehlen freien Farbstoffes (Maß für die Spezifität der Färbung).
Neben der Reinheit wurde die immunologische Aktivität der verschieden konjugierten FTC-Insuline im RIA geprüft. Das Verhältnis der ermittelten FTC-Insulin-Konzentration zur ursprünglich eingesetzten Testmenge ergab dabei eine annähernd reziprok zum Grad der Fluoreszenzmarkierung abnehmende Immunkompetenz. Dieses Ergebnis stimmt zumindest für das Mono-FTC-Insulin mit dem von Arquilla et al. (11) gefundenen Wert überein.
Eine Bedingung für die meisten Immunoassays ist, daß das von einem Antikörper gebundene Antigen von dem freien Antigen abgetrennt werden muß.
Immunologische Tests, die diese Abtrennung erfordern, sind unter dem Namen "heterogene Immunoassays" bekannt.

Als einfaches Trennverfahren bietet sich die Solid-Phase-Methode an. Dabei ist der Antikörper chemisch, kovalent an einen polymeren Träger gebunden. Das Antigen reagiert mit dem auf der Oberfläche der festen Phase fixierten Antikörper (Antigen-Antikörperreaktion).
Die Auswahl geeigneten Trägermaterials für den Insulinantikörper - Cellulose und Sepharose - wurde in einer früheren Arbeit überprüft (36). Dort konnte ein beinahe vollständiger Verlust der Insulinbindungskapazität der Antikörper gezeigt werden, die an Sepharose als Träger gebunden waren. Aussagen über eine mangelhafte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der Verwendung von Cellulose-Blauband Nr. 589^3 als feste Phase für den Insulinantikörper ließen sich jedoch in der hier vorliegenden Untersuchung nicht bestätigen. Die Versuche wurden daher mit diesem Trägermaterial durchgeführt. Dazu wurde der Antikörper mittels BrCN-Aktivierung kovalent an das Polysaccharid Cellulose gebunden.
Bei der Proteinbestimmung der Antikörper-gekoppelten Cellulose-Plättchen wurde festgestellt, daß nur 12,5 % des angebotenen Proteins bei der BrCN-aktivierten Kopplung gebunden wurden. Den fast identischen prozentualen Anteil der theoretischen Kapazität fand man bei der Bestimmung der Mono-FTC-Insulin-Bindungskapazität der Plättchen über den FIA. Daraus folgt wiederum, daß die Immunkompetenz des Mono-FTC-Insulins voll erhalten bleibt.
Um die Zuverlässigkeit der erhaltenen Resultate und damit die Qualität eines Fluoreszenz-Immuno-Assays beurteilen zu können, müssen einige charakteristische Kriterien bekannt sein. Hierzu gehören neben Genauigkeit, Reproduzierbarkeit, Handhabung und Zeitaufwand vor allem die Spezifität und Empfindlichkeit eines Assays.

Gerade diese beiden zuletzt genannten Faktoren scheinen jedoch die limitierenden Punkte für die Übertragung dieses Modell-Fluoreszenz-Immuno-Assays auf die Bestimmung des Insulins direkt aus dem Serum heraus zu sein. Einerseits findet man dort eine hohe unspezifische Eigenfluoreszenz, welche die Fluoreszenzmessung im Überstand stört, zum andern wird bei der Gewinnung des Dissoziates von den Cellulose-Plättchen bei hohen Proteinkonzentrationen ebenfalls unspezifische Fluoreszenz freigesetzt (36).
Die Sensibilität des Assays beinhaltet die Veränderungen der Fluoreszenzausbeute bei bestimmter Antigen-Konzentrationszunahme. Dieses Verhalten drückt die Steilheit der Standardkurve aus. Sie verläuft bei niedrigen Insulinwerten noch zu flach.
Um eine ausgewogene Bindung des markierten Antigens zum Antikörper zu erreichen, bedarf es daher noch der Ermittlung einer optimalen Reagenzienkonzentration, damit man als Endresultat eine ausreichend steile Kurve mit genügender Aussagekraft auch bei niedrigen Insulinkonzentrationen erhält.

E Abkürzungen

Ak	Antikörper
B_o	freies, markiertes Antigen
B	gebundenes, markiertes Antigen
Bl	Blank
BSA	Bovine Serum Albumin
CPM	Counts per Minute
C_a	Konzentration von a
D	Dissoziat
DBA	Dextran-beschichtete Aktivkohle
DC	Dünnschicht-Chromatographie
E_a	Extinktion bei a nm
F	Fluorescein
FE	Fluoreszenzeinheiten
FIA	Fluoreszenz-Immuno-Assay
FIKA	Fluoreszenz-Immuno-Kompetitions-Assay
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FTC-	Fluoresceinthiocarbamyl-
H. V.	High Voltage
IE bzw. U	Internationale Einheit
Kon-Ser	Kontrollserum
M-FTC-I	Mono-FTC-Insulin
MG	Molekulargewicht
MK	Mittelwert-Korrigiert
MW	Mittelwert
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PVA	Polyvinylacetat
PVC	Polyvinylchlorid
RIA	Radio-Immuno-Assay
RS	Rinderserum
RT	Raumtemperatur
Sens	Sensitivity
St.K.	Standardkurve
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü	Überstand
u	mikro

F Literaturverzeichnis

1. J. P. Felber (1973)
Klin. Wschr. 51, 63
Clinical use of radioimmunological plasma insulin assessment

2. R. S. Yalow, S. A. Berson (1959)
Nature 21, 1648
Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods

3. R. S. Yalow, S. A. Berson (1960)
J. Clin. Invest. 39,1157
Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man

4. H. Breuer, D. Hamel, H. L. Krüskemper (1975)
Methoden der Hormonbestimmung
Thieme, Stuttgart

5. D. N. Halikis, E. R. Arquilla (1961)
Diabetes 10, 142
Studies on the Physical, Immunological and Biological Properties of Insulin Conjugated with Fluorescein Isothiocyanate

6. F. Tietze, G. E. Mortimore, N. R. Lomax (1962)
Biochim. Biophys. Acta 59, 336
Preparation and Properties of Fluorescent Insulin Derivatives

7. W. W. Bromer, A. W. Berns, S. Knapp, E. R. Arquilla (1966)
Diabetes 15, 523
The Preparation and Properties of Fluoresceinthiocarbamyl-Insulins

9. W. W. Bromer, S. Knapp-Sheehan, A. W. Berns, E. R. Arquilla (1967)
Biochemistry 6, 2378
Preparation and Properties of Fluoresceinthiocarbamyl-Insulins

9. E. R. Arquilla, W. W. Bromer, D. Mercola (1969)
Diabetes 18, 193
Immunology Conformation and Biological Activity of Insulin

10. D. A. Mercola, J. W. S. Morris, E. R. Arquilla (1972)
Biochemistry 11, 3860
Use of Resonance Interaction in the Study of the Chain Folding of Insulin in Solution

11. E. R. Arquilla, H. Ooms, J. Finn (1966)
Diabetologia 2, 1
Genetic Differences of Combining Sites of Insulin Antibodies and Importance of C-Terminal Portion of the A-Chain to Biological and Immunological Activity of Insulin

12. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265
Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent

13. A. T. Moore, W. H. Stein (1954)
J. Biol. Chem. 211, 907
A modified Ninhydrin Reagent for the Photometric Determination of Amino Acids and Related Compounds

14. A. T. Moore, W. H. Stein (1948)
J. Biol. Chem. 176, 367
Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids

15. R. M. Mc Kinney, F. C. Churchill, J. T. Spillane, G. W. Pearce (1969)
Anal. Biochem. 29, 526
Characterization of Fluorescein Isothiocyanate Dyes by Infrared and Thin-Layer Chromatography Methods

16. R. M. Mc Kinney, J. T. Spillane, G. W. Pearce (1964)
J. Immunol. 93, 232
Factors Affecting the Rate of Reaction of Fluorescein Isothiocyanate with Serum Proteins

17. F. H. Carpenter, S. L. Hayes (1963)
Biochemistry 2, 1272
Electrophoresis on Cellulose Acetate of Insulin and Insulin-Derivatives: Correlation with Behavior on Countercurrent Distribution and Partition-Column Chromatography

18. G. Wick, S. Baudner, F. Herzog (1976)
Immunfluoreszenz
Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg

19. R. M. Mc Kinney, J. T. Spillane, G. W. Pearce (1966)
Anal. Biochem. 14, 421
A Simple Method for Determining the Labeling Efficiency of Fluorescein Isothiocyanate Products

20. R. M. Mc Kinney, J. T. Spillane, G. W. Pearce (1964)
Anal. Biochem. 8, 525
Storage Stability of Fluorescein Isothiocyanate

21. T. Löfkvist, J. Sjöquist (1963)
Int. Arch. Allergy 23, 289
Purification of Staphylococcal Antigens

22. F. Schröpl (1964)
Klin. Wschr. 42, 986
Über ein einfaches Verfahren zur präparativen Elektrophorese

25. Schwarz-Mann, Division of Becton, Dickinson and Co. (1976)
Insulin Radioimmunoassay Kit ^{125}J
Procedure for the Quantitative Radioimmunoassay of Insulin Levels in Serum or Plasma Using ^{125}J as Marker
Orangeburg, N. Y.

26. V. Herbert, K. S. Lau, C. W. Gottlieb, S. J. Bleicher (1965)
J. Clin. Endocr. 25, 1375
Coated Charcoal Immunoassay of Insulin

27. H. G. Eckert (1976)
Angewandte Chemie 88/17, 565
Die Technik des Radio-Immuno-Assay

28. K. Diem, C. Leutner (1977)
Documenta Geigy Wissenschaftliche Tabellen
Geigy Pharmazeutika, Wehr (Baden)

29. D. Rodbard, W. Bridson, P. L. Rayford (1969)
J. Lab. & Clin. Med. 74, 770
Rapid Calculation of Radioimmunoassay Results

30. J. Porath (1974) in
Methods in Enzymology, Vol XXXIV, S. 21
The Cyanogen Bromide Method of Coupling

31. R. Axén, J. Porath, S. Ernback (1967)
Nature 214, 1302
Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides

32. R. Axén, S. Ernback (1971)
Eur. J. Biochem. 18, 351
Chemical Fixation of Enzymes to Cyanogen Halide Activated Polysaccharide Carriers

31. E. R. Arquilla, A. B. Stavitsky (1956)
J. Clin. Invest. 35, 458
The Production and Identification of Antibodies to Insulin and Their Use in Assaying Insulin

32. R. C. Aalberse (1973)
Clin. Chim. Acta 48, 109
Quantitative Fluoroimmunoassay

33. W. B. Dandliker, R. Alonso, V. A. des Saussure, F. Kierszenbaum, S. A. Levison, H. C. Schapiro (1967)
Biochemistry 6, 1460
The Effect of Chaotropic Ions on the Dissociation of Antigen-Antibody Complexes

34. H. P. Brusman (1971)
Anal. Biochem. 44, 606
Spectrophotometric Determination of Fluorescein/Protein Ratios: Some Theoretical and Practical Considerations

35. A. Jobaggy, K. Kiraly (1965)
Biochim. Biophys. Acta 124, 166
Chemical Characterization of Fluorescein-Isothiocyanate-Protein Conjugates

36. H. Kollaschinski, D. Palm (1978)
Entwicklung einer fluoreszenzspektroskopischen Methode für den Immunoassay des Insulins
Diplomarbeit, Würzburg

37. J. B. Hill (1959)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102, 75
Adsorption of Insulin to Glass

38. A. H. Coons, H. J. Creech, R. N. Jones, E. Berliner (1942)
J. Immunol. 45, 159
The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody

Lebenslauf

Geburtsdatum	28.03.1948
Geburtsort	Amberg (Opf.)
Eltern	Ludwig Siegl, Rektor a. D. Antonie Siegl, geb. Adlhoch
Sept. 1954 - Juli 1959	Volksschule Kastl
Sept. 1959 - Juli 1968	Math.-Nat. Gymnasium Neumarkt (Opf.)
23. Juli 1968	Abitur
Wintersemester 1968/69	Jurastudium Universität Erlangen
Sommersemester 1969 - Sommersemester 1971	Chemiestudium Universität Würzburg
1971/72	Chemiestudium State University of New York
Wintersemester 1972	Medizinstudium Universität Würzburg
26. April 1973	Vordiplom Chemie Universität Würzburg
12. Oktober 1973	Vorphysikum Universität Würzburg
10. März 1975	Physikum Universität Würzburg
23. November 1979	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Universität Würzburg
28. November 1979	Approbation
März - Juli 1980	Stabsarzt Bundeswehrkrankenhaus Amberg
August/September 1980	Assistenzarzt Kreiskrankenhaus Nabburg
Ab 1. November 1980	Assistenzarzt Städt. Marienkrankenhaus Amberg
Berufsziel	Arzt für Laboratoriumsmedizin

Amberg, 20. Januar 1980

Rainer Siegl

Druck: Buch- und Offsetdruckerei Obendorfer, 8470 Nabburg